

NO-Donor-Hybridverbindungen und andere Derivate des Flurbiprofens als potenzielle Alzheimer-Therapeutika



Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von
Kathrin Lange

geboren am 23. August 1978
in Friedrichroda

Gutachter:

1. Prof. Dr. Jochen Lehmann
2. Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein
3. Privatdozent Dr. Andreas Seeling

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.10.2008

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis Juni 2008 am Institut für Pharmazie der Friedrich-Schiller-Universität Jena angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Lehmann für seine allseits gewährte Unterstützung und Förderung meiner Arbeit auf einem interessanten Themengebiet, seine wertvollen Anregungen, konstruktive Kritik und Diskussionsbereitschaft, sowie seine freundliche, entgegenkommende und humorvolle Art.

Herrn Prof. Dr. Hans-Jürgen Duchstein danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Für die fachliche und freundliche Unterstützung in vielen Fragen möchte ich Privatdozent Dr. Andreas Seeling meinen ganz besonderen Dank aussprechen.

Allen Kooperationspartnern, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich ebenfalls danken und an entsprechender Stelle noch einmal auf sie verweisen.

Ebenfalls von Herzen danken möchte ich allen Kollegen für die herrliche Zeit in einer freundschaftlichen, angenehmen Atmosphäre und die vielfältige Unterstützung in fachlichen, aber auch persönlichen Angelegenheiten, die mich auf meine Promotionszeit mit viel Freude zurückblicken lassen werden. Besonders sind dies Patrick Mohr, Yvonne Schott und Franziska Müller, mit denen ich Büro und Labor teilen durfte, desweiteren Jörg Konter, Andreas König, Carolin Roegler, Uwe Conrad und Ronny Ludewig, die mich immer an gemeinsam verbrachte, schöne Stunden erinnern werden.

Herzlichen Dank auch an Katrin Fischer für die angenehme Zusammenarbeit und stete Hilfsbereitschaft.

Ganz besonderen Dank möchte ich meinem Freund Christian aussprechen für das große Verständnis besonders an hektischen und schwierigen Tagen, in die er mit seiner Liebe und Kochkunst wieder Ruhe brachte.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Familie, die mir immer auf liebevolle Art verständnisvoll und hilfsbereit zur Seite stand.

1. Einleitung.....	1
1.1 Allgemeines zur Alzheimer´schen Erkrankung.....	1
1.1.1 Historisches.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	1
1.1.3 Klassifizierung und Symptomatik.....	2
1.1.4 Diagnostik.....	3
1.1.5 Makroskopische Veränderungen.....	5
1.1.6 Formen der Alzheimer´schen Erkrankung.....	6
1.1.7 Risikofaktoren.....	6
1.1.7.1 Alter.....	6
1.1.7.2 Geringer Bildungsgrad.....	7
1.1.7.3 Geschlecht.....	7
1.1.7.4 Genetische Faktoren.....	7
1.1.7.5 Weitere Risikofaktoren.....	9
1.2 Pathogenese der Alzheimer´schen Erkrankung.....	9
1.2.1 β -Amyloid, APP und Sekretasen.....	10
1.2.1.1 Amyloid.....	10
1.2.1.2 APP.....	12
1.2.1.3 Sekretasen.....	15
1.2.2 Tau.....	28
1.2.3 Calcium-Homöostase.....	32
1.2.4 Inflammation und oxidativer Streß.....	37
1.3 Therapie der Alzheimer´schen Erkrankung.....	41
1.3.1 Derzeitige Pharmakotherapie.....	42
1.3.1.1 Acetylcholinesterase-Inhibitoren.....	43
1.3.1.2 NMDA-Rezeptor-Antagonisten.....	46
1.3.1.3 Nootropika.....	47
1.3.1.4 Antioxidantien.....	48
1.3.1.5 Calciumantagonisten.....	49
1.3.2 Weitere Therapieansätze.....	49
1.3.2.1 Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs).....	49
1.3.2.2 Statine.....	52
1.3.2.3 Hormone.....	53
1.3.2.4 Immuntherapie.....	54
1.3.2.5 Sekretasehemmer.....	54
1.3.2.6 β -Faltblattzerstörer und „plaque buster“.....	55

1.4	NO-NSAIDs	55
1.4.1	Entwicklung COX-selektiver NSAIDs	57
1.4.2	Entwicklung NO-freisetzender NSAIDs	57
1.4.2.1	Allgemeines über NO	57
1.4.2.2	Organische Nitrate	60
1.4.2.3	NSAID-Organonitrat-Hybridsubstanzen	61
1.5	Zielstellung der Arbeit	65
2.	Synthetischer Teil	71
2.1	Synthese monofunktionaler Flurbiprofen-Derivate	73
2.1.1	Synthese von (2S)-2-(2-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)propan-1-ol	73
2.1.2	Synthese von (2S)-2-(2-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoylchlorid	74
2.1.3	Synthese einfacher Ester des Flurbiprofen	76
2.1.4	Synthese von Glycerolestern des Flurbiprofen	84
2.1.5	Synthese von Piperazinamid-Derivaten des Flurbiprofen	89
2.1.6	Synthese von (2S)-2-(2-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)pentan-3-on	92
2.1.7	Synthese von <i>N</i> -[(2S)-2-(2-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]glycin	98
2.1.8	Synthese von (2S)-2-(2-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)- <i>N</i> -(2-hydroxyethyl)propanamid; <i>N</i> -(2-chloroethyl)-(2S)-2-(2-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)propanamid und (2S)-2-(2-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)- <i>N</i> -[(2-morpholin-4-yl)ethyl]propanamid	102
2.1.9	(2S)-2-(2-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)- <i>N</i> -(2-iodoethyl)propanamid	110
2.2	Synthese der aktiven Metaboliten des PETN und GTN	112
2.2.1	Allgemeine Prinzipien bei der Herstellung von organischen Nitraten	112
2.2.2	Synthese von Pentaerythritoltetranitrat (PETN)	116
2.2.3	Synthese von Pentaerythritoltrinitrat (PETriN)	117
2.2.4	Synthese von Pentaerythritoldinitrat (PEDiN)	123
2.2.5	Synthese von Pentaerythritolmononitrat (PEMN)	130
2.2.6	Synthese von Glycerol-1,2-dinitrat (1,2-GDN)	134
2.2.7	Synthese von Glycerol-1,3-dinitrat (1,3-GDN)	140
2.2.8	Synthese von Glycerol-1-mononitrat (1-GMN)	143
2.2.9	Synthese von Glycerol-2-mononitrat (2-GMN)	147
2.3	Synthese bifunktionaler NSAID-Organonitrat-Hybridverbindungen	157
2.3.1	Syntheseversuche zur Darstellung von Flurbiprofen-Organonitrat-Hybridverbindungen aus bromierten Vorstufen	157

2.3.1.1	Synthese der bromierten Ausgangsstoffe.....	157
2.3.1.2	Syntheseversuch zur Darstellung einer Flurbiprofen-PEDiN-Hybridverbindung	161
2.3.2	Synthese von Flurbiprofen-Organonitrat-Hybridsubstanzen unter Verwendung der aktiven Metaboliten des PETN.....	163
2.3.3	Synthese von Hybridsubstanzen aus Indometacin und PEDiN.....	176
2.3.4	Darstellung weiterer NSAID-Organonitrat-Hybridsubstanzen.....	181
2.3.4.1	Synthese von 2-(Nitrooxy)ethyl (2S)-2-(2-fluoro-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat.....	181
2.3.4.2	Synthese von NSAID-Organonitrat-Hybridverbindungen aus Flurbiprofenderivaten mit PETriN oder Nitratopivalinsäure.....	185
3.	Pharmakologischer Teil.....	191
3.1	Testung auf Aβ-senkende Wirkung.....	191
3.1.1	Methodenbeschreibung.....	191
3.1.1.1	Zellkultur und Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen.....	191
3.1.1.2	Sandwich-ELISA zur Bestimmung der A β -Sekretion.....	192
3.1.2	Ergebnisse und Diskussion.....	192
3.2	Bestimmung der COX-1- und COX-2-Inhibition.....	195
3.2.1	Methodenbeschreibung.....	197
3.2.1.1	Vollbluttestung COX-1-Assay.....	197
3.2.1.2	Vollbluttestung COX-2-Assay.....	197
3.2.2	Ergebnisse und Diskussion.....	198
3.2.2.1	COX-1-Assay.....	198
3.2.2.2	COX-2-Assay.....	200
3.2.2.3	Bestimmung der IC ₅₀ -Werte ausgewählter Substanzen an der COX-1 und COX-2.....	202
3.3	Bestimmung der NMDA-antagonistischen Wirkung.....	203
3.3.1	Methodenbeschreibung des NMDA-Assays.....	204
3.3.2	Ergebnisse und Diskussion.....	206
3.4	<i>In vivo</i> Untersuchung der neuroregenerativen Eigenschaften einer Indometacin-PEDiN-Hybridverbindung.....	208
3.4.1	Methodenbeschreibung.....	208
3.4.2	Ergebnisse und Diskussion.....	209

3.5	Vasodilationsversuche <i>in vitro</i>	209
3.5.1	Methodenbeschreibung	210
3.5.2	Ergebnisse und Diskussion	210
3.5.2.1	Metaboliten des PETN und GTN sowie 2-GMN-1,3-diacetat	210
3.5.2.2	NSAID-Nitrat-Hybridsubstanzen	212
4.	Zusammenfassung	215
5.	Experimenteller Teil	222
5.1	Geräte, Materialien und analytische Methoden	222
5.1.1	Dünnschichtchromatographie	222
5.1.2	Säulenchromatographie	222
5.1.3	Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometer	222
5.1.4	Hochleistungsflüssigchromatographie	223
5.1.5	Kernresonanzspektroskopie	225
5.1.6	IR-Spektroskopie	225
5.1.7	Schmelzpunktbestimmung	225
5.1.8	Massenspektrometrie	225
5.1.9	Elementaranalyse	226
5.2	Synthesen	226
5.2.1	Vergleichsmonographien von Flurbiprofen und Indometacin	226
5.2.1.1	Flurbiprofen	226
5.2.1.2	Indometacin	227
5.2.2	Monographien	227
6.	Abkürzungsverzeichnis	
7.	Literaturverzeichnis	
	Lebenslauf	
	Publikationsverzeichnis	
	Selbstständigkeitserklärung	

1. Einleitung

1.1 Allgemeines zur Alzheimer'schen Krankheit

1.1.1 Historisches

Die Alzheimer'sche Krankheit, Alzheimer Demenz (AD) oder kurz „Alzheimer“ ist eine fortschreitende degenerative Erkrankung des Gehirns, die 1907 zum ersten Mal von dem deutschen Neurologen Alois Alzheimer beschrieben wurde. An seiner Patientin Auguste



Abb. 1.1: Alois Alzheimer

Deter beobachtete er Veränderungen im Verhalten beginnend mit Gedächtnisstörungen, Schlaflosigkeit, Stimmungsschwankungen und Verfolgungswahn bis hin zu Antriebslosigkeit und zur völligen Veränderung der Persönlichkeit. Nach ihrem Tode erkannte er bei der mikroskopischen Untersuchung ihres Gehirns zu Grunde gegangene Nervenzellen, sowie bis dahin nicht beschriebene extrazelluläre Eiweißablagerungen (sog. Plaques) und seltsame intrazelluläre Faserbündel (sog. Tau-Fibrillen) in der gesamten Hirnrinde. Ein dreiviertel



Abb. 1.2: Auguste Deter

Jahrhundert später galt die Krankheit jedoch noch immer als eine exotische, selten auftretende Altersdemenz (Alterschwachsinn). Erst durch die steigende allgemeine Lebenserwartung und eine dadurch bedingte erhöhte Zahl an Neuerkrankungen gewann die Alzheimer'sche Erkrankung nach und nach mehr Aufmerksamkeit.

1.1.2 Epidemiologie

In westlichen Industrienationen ist die Alzheimer'sche Krankheit mittlerweile die vierthäufigste Todesursache, wobei in Deutschland etwa eine Million und weltweit ca. 26 Millionen Menschen erkrankt sind [Eckert, 2005; Intq 1; Intq 2]. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko zu erkranken stark an. Gleichaltrige Frauen und Männer zeigen keine Unterschiede in der Erkrankungshäufigkeit, der Anteil der erkrankten Frauen ist jedoch aufgrund ihrer höheren Lebenserwartung insgesamt betrachtet deutlich größer (s. Kap. 1.1.7.3).

Die Zahl der Erkrankungen könnte aufgrund der sich verändernden Altersstruktur weltweit bis zum Jahr 2030 auf etwa 60 Millionen anwachsen [Fillit, 2002], was eine enorme soziale und ökonomische Last bedeuten würde. Die Pflege eines Alzheimer-Kranken in Deutschland kostet durchschnittlich 44.000 Euro pro Jahr [Hallauer, 2000]; neuere Schätzungen nennen Beträge von bis zu 90.000 Euro. Aufgrund dieser zunehmenden sozialen und finanziellen Belastungen der Gesellschaft ist die Früherkennung sowie die Entwicklung neuer medikamentöser Therapien Gegenstand intensiver Forschung.

1.1.3 Klassifizierung und Symptomatik

Die Alzheimer'sche Krankheit ist eine Form der Demenz, wobei unter Demenz ein Sammelbegriff für den fortschreitenden Abbau kognitiver, emotionaler und sozialer Fähigkeiten oder Leistungen zu verstehen ist, der zu einer Beeinträchtigung von sozialen und beruflichen Funktionen führt. Es werden primäre und sekundäre Formen der Demenz unterschieden. Dabei machen die primären Formen, zu denen die AD, vaskuläre Demenzen, die Lewy-Body-Demenz, sowie die Frontotemporale Demenz zählen, mit 80 - 90 % den größten Teil aus. Hier liegen entweder neurodegenerative oder vaskuläre Veränderungen vor, die überwiegend im höheren Alter auftreten. Bei den sekundären Formen ist die Demenz die Folge einer organischen Erkrankung wie z.B. einer Hirnverletzung, eines Tumors, einer Vergiftung oder einer Herz-Kreislauf-Krankheit.

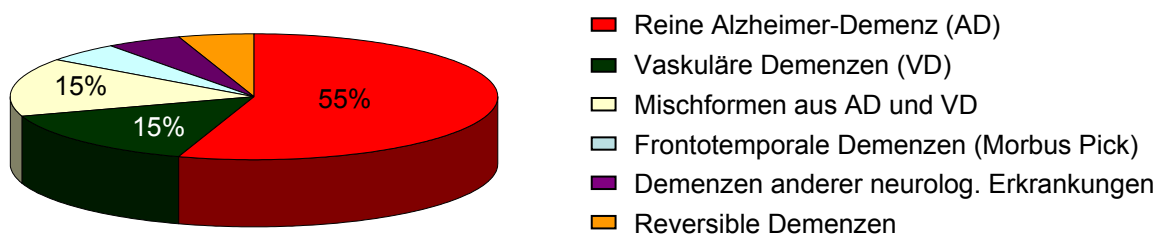


Abb. 1.3: Häufigkeit der Demenz vom Alzheimerstyp und vaskulärer Demenz [Intq 3]

Die Alzheimer'sche Krankheit ist die häufigste Form der Demenz (s. Abb. 1.3) und ist gekennzeichnet durch eine lange vorklinische Phase ohne spezifische Symptome, gefolgt von umfangreicher neuronaler Degeneration vor allem von cholinergen Neuronen, der Auflösung von synaptischen Verbindungen und dem fortschreitenden Verlust höherer kognitiver Funktionen. Medizinisch kann der Verlauf der Erkrankung grob in drei Stadien eingeteilt werden, welche in Tab. 1.1 mit ihren Symptomen zusammengefasst sind. Die Geschwindigkeit und Ausprägung mit der die Krankheitszeichen voranschreiten, kann allerdings individuell sehr verschieden sein.

Stadium	Symptome
I	<ul style="list-style-type: none"> - Vergesslichkeit (Amnesie) - Orientierungslosigkeit - Stimmungsschwankungen, Beeinträchtigung des Urteilsvermögens - Wortfindungsstörungen (Aphasie) - Verständnisschwierigkeiten bei abstrakten Begriffen - Vernachlässigung der Körperpflege - zunehmende Interesselosigkeit - beginnende Persönlichkeitsveränderungen
II	<ul style="list-style-type: none"> - ausgeprägte Störungen des Gedächtnisses, der Sprache und der Orientierung - starke Leistungsschwankungen - Stimmungsschwankungen nehmen zu (Angst, Frustration, Traurigkeit) - Wahrnehmungsstörungen (Agnosie) - zwanghafte Verhaltensweisen, Wahnvorstellungen, Paranoia, Depression - Koordinationsprobleme bei täglichen Aufgaben wie Anziehen, Essen, Baden (Apraxie) - ggf. Ausübung gewaltsamer Handlungen - beginnende Inkontinenz - Hilfe im Alltag notwendig
III	<ul style="list-style-type: none"> - gänzliches Versagen des Gedächtnisses - Schluckstörungen - Kontrollverlust für Blasen- und Stuhlentleerung - extreme Verminderung des Wortschatzes mit weitgehendem Verlust der Sprachfähigkeit - fast vollständiger Verlust der Wahrnehmung der Umwelt - Teilnahmslosigkeit - zunehmender Verlust der motorischen Fähigkeiten bis hin zur Bettlägerigkeit - absolute Pflegebedürftigkeit

Tab. 1.1: Symptomatik der AD [Intq 4,5,6]

1.1.4 Diagnostik

Eine sichere Diagnose ist erst nach dem Tod möglich, wenn die Veränderungen im Gehirn mit den typischen Ablagerungen durch eine Sektion sichtbar werden (s. Kap. 1.1.5). Andererseits ist die möglichst frühe Diagnose einer demenziellen Erkrankung hinsichtlich einer therapeutischen Behandlung ausgesprochen wichtig und wäre auch aus ökonomischer Sicht vorteilhaft, da durch einen frühen Behandlungsbeginn der Zeitpunkt der erhöhten Pflegebedürftigkeit hinausgezögert werden kann und damit die Pflegekosten sinken. Da es bis jetzt keinen einzelnen krankheitsdefinierenden Marker gibt, muss die Diagnose durch eine Kombination aus klinischem Krankheitsbild, bildgebenden Verfahren, Laboruntersuchungen (z.B. der Zerebrospinalflüssigkeit) sowie neuropsychologischen und neurophysiologischen Untersuchungen erfolgen [Hampel, 2003].

Für eine möglichst frühzeitige Diagnose werden daher neben laborchemischen Blutuntersuchungen und Interview-Testverfahren wie dem Mini Mental Status Test (MMST) (s. Abb. 1.4) oder dem Uhrentest [Intq 7], Untersuchungen wie Elektrokardiogramm (EKG) und die bildgebenden Verfahren Computertomographie (CT),

Magnetresonanztomographie (MRT), sowie die Single-Photon-Emissions-Tomographie (SPECT) und Positronen-Emissions-Tomographie (PET) durchgeführt.

Der Mini Mental Status Test (MMST) [Intq 7], auch Mini Mental Status Examination (MMSE) genannt, erfasst mit insgesamt 30 Punkten die kognitive Leistungsfähigkeit und ermöglicht eine Einschätzung des Schweregrades der kognitiven Beeinträchtigung [Folstein, 1975]. Folgende Einteilung hat sich bezüglich der Punktezahl etabliert:

- 0-11 schwere Demenz
- 12-18 mittelschwere Demenz
- 19-23 leichte Demenz
- 24-26 kognitive Beeinträchtigung
- 27-30 unbeeinträchtigte Leistungsfähigkeit

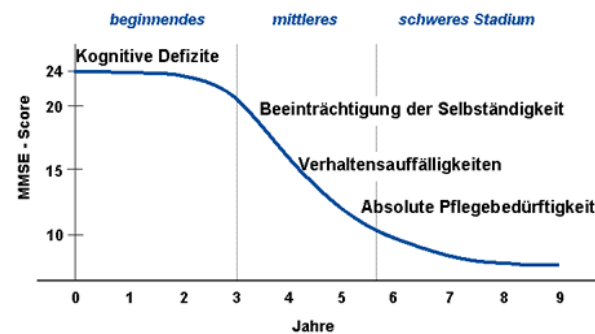


Abb. 1.4: Verlauf einer Demenz vom Alzheimer-Typ gemessen am MMSE-Score [Intq 8]

Weitere Klassifizierungssysteme sind z.B. das DSM-IV (vierte Ausgabe des *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) allein für psychische Störungen und Verhaltensauffälligkeiten sowie die ICD-10 (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10*) für alle Krankheiten, äußere Ursachen von Krankheiten und Todesfällen, und Umständen, die den Gesundheitszustand beeinflussen [Intq 9].

nach ICD-10 (Weltgesundheitsorganisation 1991)	nach DSM-IV (American Psychiatric Association 1994)
<ul style="list-style-type: none"> Abnahme des Gedächtnisses und des Denkvermögens, der Urteilkraft, des Ideenflusses und der Informationsverarbeitung Schleichender Beginn mit langsamer Verschlechterung Fehlen klinischer Hinweise oder spezieller Untersuchungsbefunde, die auf eine andere Demenzursache hinweisen Fehlen eines plötzlichen apoplektischen Beginns oder neurologischer Herdzeichen (solche Phänomene können später hinzukommen) Dauer der Symptome seit mindestens sechs Monaten 	<ul style="list-style-type: none"> Nachweis einer Gedächtnisstörung und mindestens eine der folgenden kognitiven Störungen: Aphasie, Apraxie, Agnosie, Störung der Exekutivfunktionen Schleichender Beginn mit meist progredientem Verlauf und allmählicher Verschlechterung Ausschluss aller anderen spezifischen Ursachen einer Demenz durch Anamnese, körperlichen Befund und technische Zusatzuntersuchungen

Tab. 1.2:
diagnostische
Kriterien bei
Demenzen vom
Alzheimer-Typ
[Intq 10]

Das DSM-IV ist im Gegensatz zur ICD-10 ein an nationale Verhältnisse angepasstes Klassifikationssystem. In Tab. 1.2 sind die diagnostischen Kriterien der AD nach ICD-10 und DSM-IV aufgelistet.

Zur Beurteilung der therapeutischen Wirksamkeit von Verbindungen bei klinischen Studien wird häufig die „Alzheimer’s Disease Assessment Scale – cognitive subscale“ (ADAS-cog.) verwendet, welche Leistungen des Gedächtnisses, der Orientierung und Aufmerksamkeit sowie Sprache und praktische Fähigkeiten in eine Skala von 0 (nur richtige Antworten, gesund) bis 70 (keine richtige Antwort, sehr schwere Demenz) einordnet. Die ADAS-cog. ist speziell zur Anwendung bei AD validiert.

Im Frühstadium der AD ist eine Diagnose schwierig. Therapieansätze sind aber gerade in diesem Stadium wahrscheinlich um ein Vielfaches effektiver als bei einer bereits bestehenden schwerwiegenden Neurodegeneration.

1.1.5 Makroskopische Veränderungen

Die Neuropathologie von AD ist primär gekennzeichnet durch das Auftreten von intrazellulären neurofibrillären Bündeln (NFTs) aus Tau-Protein, extrazellulären β -Amyloidablagerungen (A β) und neuronaler Degeneration. Im frühen Stadium zeigt sich zunächst eine Verringerung der Zahl der Synapsen zwischen den Nervenzellen und im weiteren Verlauf kommt es zum Absterben ganzer Nervenzellen. Diese Rückbildung der Gehirnstruktur verringert das Gehirnvolumen und verändert die Hirnfurchen und Hirnkammern so, dass sich die Gehirnwasserräume erweitern und mit Liquor füllen. Der Verlust an Neuronen in den betroffenen Hirnarealen kann bis zu 50 % betragen. Das äußere Erscheinungsbild bzw. der Querschnitt durch ein Alzheimer-Gehirn sind in den Abb. 1.5 und 1.6 dargestellt:

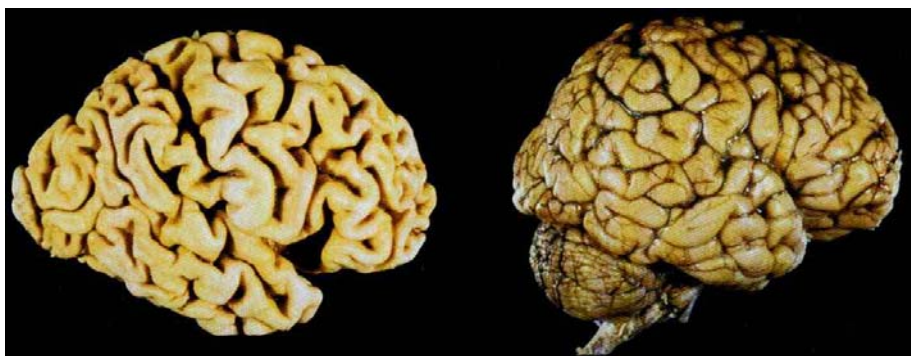


Abb. 1.5: Gehirn eines Alzheimer-Patienten (links) und eines gesunden Menschen (rechts) [St. George - Hyslop, 2001]

Lichtmikroskopische Analysen von Sektionen aus Gehirnen von Alzheimer-Patienten zeigen neurofibrilläre Bündel und Amyloid-Plaques (s. Abb. 1.7).

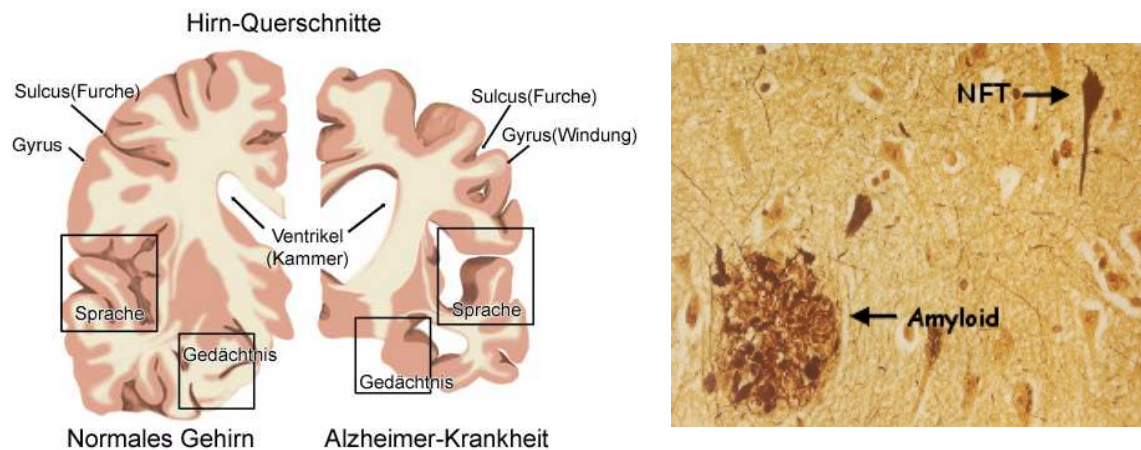


Abb. 1.6: Querschnitt durch das Gehirn eines gesunden Menschen (links) und das eines Alzheimer-Patienten (rechts) [Intq 11]

Abb. 1.7: Amyloid-Plaques und neurofibrilläre Bündel (NFT) im Gehirn von Alzheimer-Patienten [Intq 12]

1.1.6 Formen der Alzheimer'schen Erkrankung

Die mit 90 % der Fälle häufigste Form der Alzheimer'schen Erkrankung erscheint sporadisch und im höheren Lebensalter, normalerweise ab etwa 65 Jahre.

Die familiäre Form (etwa 5-10 % aller AD-Fälle) entwickelt die AD-Symptomatik bereits vor dem 65. Lebensjahr, d.h. typischerweise zwischen dem 40. und 50. und in seltenen Fällen schon um das 20. Lebensjahr [Bird, 2005]. Die Ursache der familiären Form ist in 50 % aller Fälle in Punktmutationen der Gene für Presenilin 1 und 2 (PS 1 und 2) und β -Amyloid-Precursor-Protein (APP) zu suchen [Newman, 2007] (s. Kap. 1.1.7.4). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass neben den genannten Mutationen noch weitere für die Ausprägung der AD verantwortlich sind [Bird, 2005]. Die pathologischen Charakteristika der familiären und der sporadischen Form von AD sind identisch. Die größten Risikofaktoren für die sporadische Form der AD sind die $\epsilon 4$ -Isoform des Apolipoprotein E sowie das Alter (s. Kap. 1.1.7).

1.1.7 Risikofaktoren

1.1.7.1 Alter

Neben der familiären Vorbelastung ist das Alter einer der primären Risikofaktoren bei AD. Zur Zeit ist noch unklar, wie Alterungsprozesse die Entwicklung von AD oder das Risiko zu erkranken fördern [Keller, 2006]. Verschiedene Möglichkeiten wie z.B. zunehmende altersbedingte Neuropathien werden in diesem Zusammenhang diskutiert.

1.1.7.2 Geringer Bildungsgrad

Es gibt eine Diskrepanz zwischen den pathologischen Veränderungen und den auftretenden kognitiven Defiziten, was zu der Schlussfolgerung führte, dass es eine sogenannte „kognitive Reserve“ geben könnte [Snowdon, 1997; Keller, 2006]. Menschen mit einer solchen Reserve könnten länger erfolgreich neuropathologischen Veränderungen widerstehen, die in Personen mit geringeren kognitiven Fähigkeiten bereits für die Ausprägung einer Demenz ausreichen würden [Whalley, 2004]. Ein höherer Bildungsgrad sowie geistige Beanspruchung im Alter könnten somit den Ausbruch der kognitiven Symptomatik der AD verzögern bzw. im umgekehrten Fall beschleunigen.

1.1.7.3 Geschlecht

Demenzen befallen Männer und Frauen gleichen Alters mit einer etwa gleichen Wahrscheinlichkeit. Trotzdem sind weitaus mehr Frauen als Männer von einer Demenzerkrankung betroffen. Da Frauen eine höhere Lebenserwartung als Männer haben, sind sie vor allem auf den höchsten Altersstufen, in denen das Erkrankungsrisiko steil zunimmt, stark überrepräsentiert. Diese Überrepräsentierung bringt es mit sich, dass sowohl von den Neuerkrankungen als auch von den bestehenden Demenzerkrankungen etwa 70 % auf die Frauen entfallen und nur 30 % auf die Männer [Intq 13,14].

1.1.7.4 Genetische Faktoren

Einen weiteren primären Risikofaktor stellt die familiäre Vorbelastung dar, da besonders bei der familiären Form der AD genetische Faktoren eine große Rolle spielen können. So wird die relativ frühzeitig eintretende Form der Krankheit durch Defekte in einem von 4 Genen verursacht, welche für Presenilin 1 (Chromosom 14), Presenilin 2 (Chromosom 1) und β -Amyloid-Precursor-Protein (APP) (Chromosom 21) codieren. Eine Variante des Apolipoprotein E - Gens (ApoE4) auf Chromosom 19 erhöht beim Träger das Risiko für die Alzheimer-Krankheit.

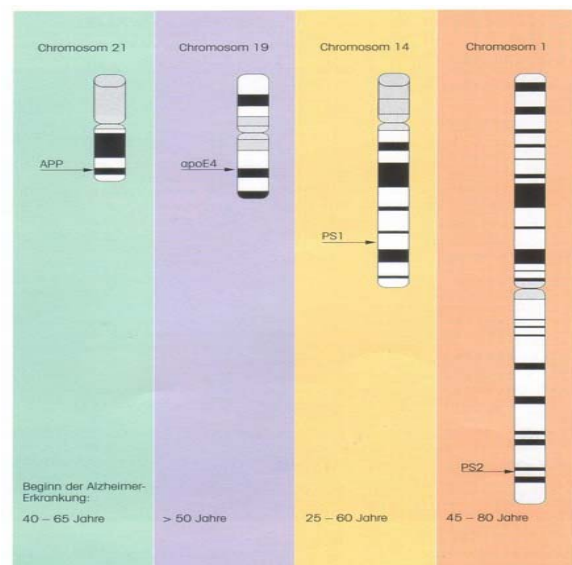


Abb. 1.8: Lokalisierung bestimmter Mutationen im APP-, PS1-, PS2- und ApoE-Gen (Abb. aus [Intq 15])

(1) Die Erbinformation für das **Amyloid-Vorläufer-Protein** und damit auch für β -Amyloid liegt auf Chromosom 21. Dies erklärt, warum Menschen mit Trisomie 21 häufiger und früher an einer Demenz vom Alzheimer-Typ erkranken als andere Menschen [Selkoe, 1996]. Aufgrund der 3-fachen Ausführung des Chromosoms 21 besitzen sie ein zusätzliches APP-Gen in allen Körperzellen und bilden folglich etwa die 1,5-fache Menge an APP (und damit ggf. an $A\beta$) als gesunde Menschen. Das erhöht ihr Risiko Amyloid-Plaques zu entwickeln beträchtlich. Nahezu alle über 30-jährigen Trisomie-21-Patienten leiden an der Alzheimer-Krankheit.

Zur Zeit sind etwa 27 Mutationen im APP-Gen bekannt, welche innerhalb oder in der unmittelbaren Nachbarschaft der $A\beta$ -Region gefunden wurden [Newman, 2007]. Sie betreffen daher zumindest indirekt die Schnittstellen einer der drei Sekretasen (s. Kap. 1.2.1.2 und 1.2.1.3). Bei einer Mutation, bekannt als die „swedish mutation“, sind zwei Aminosäuren verändert, die den Aminoterminus von $A\beta$ ausmachen. Diese Doppelmutation an der β -Sekretase-Schnittstelle führt zu einer dramatischen Erhöhung der $A\beta$ -Produktion [Haass, 1995], da durch die Mutation offensichtlich die Affinität zur β -Sekretase im Vergleich zur α -Sekretase erhöht wird. Die „dutch mutation“ führt dagegen zu einer erhöhten Aggregationsfreudigkeit der $A\beta$ -Fibrillen und Protofibrillen im Vergleich zum „Wildtyp“ [Newman, 2007].

Verschiedene Mutationen an der γ -Sekretase-Schnittstelle verursachen keine gesteigerte $A\beta$ -Produktion, sondern führen z.B. zu einem um zwei Aminosäuren verlängerten $A\beta_{42}$ -Protein, das anstelle von 40 Aminosäuren 42 enthält. Das längere $A\beta_{42}$ aggregiert offensichtlich leichter zu Plaques als das kürzere $A\beta_{40}$.

(2) Die **Preseniline (PS)** sind Bestandteile der γ -Sekretase (s. Kap. 1.2.1.3). Erbdefekte im Presenilin-1-Gen führen zum frühesten bekannten Krankheitsausbruch. In Einzelfällen erkranken die Genträger bereits vor dem 30. Lebensjahr. Allein die Defekte im Presenilin-1-Gen verursachen über die Hälfte aller erblichen Alzheimer-Fälle. Etwa 157 verschiedene Mutationen wurden in diesem Gen bereits entdeckt [Tandon, 2002; Newman, 2007]. Mutationen in den PS beeinflussen die Protein-Interaktionen des γ -Sekretase-Komplexes durch Konformationsänderungen, welche auch die APP-Verarbeitung betreffen und das Verhältnis $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ verändern können. Bei den Trägern defekter Presenilin-Gene sowie bei einigen Trägern defekter APP-Gene ist im Vergleich zu $A\beta_{40}$ eine große Menge des langen, besonders aggregationsfreudigen $A\beta_{42}$ -Proteins in den Amyloid-Plaques zu finden [Newman, 2007].

(3) **Apolipoprotein E (ApoE)** gilt derzeit als einer der wichtigsten genetischen Risikofaktoren besonders bei der sporadischen AD. Dabei handelt es sich um ein

polymorphes Protein, welches am Transport und der Verteilung von Lipiden zwischen verschiedenen Geweben bzw. Zellen beteiligt ist. Es kommt hauptsächlich in drei Isoformen vor, die durch die drei Allele für ApoE $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$ auf dem Chromosom 19 codiert werden. Erbträger der $\epsilon 4$ -Form des Apolipoproteins E leiden häufiger an erhöhten Cholesterolspiegeln und die Alzheimer'sche Krankheit tritt bei ihnen gewöhnlich einige Jahre früher auf, wobei dieser Effekt bei Homozygoten deutlicher wird als bei Heterozygoten [Newman, 2007]. Das Vorhandensein des ApoE4-Allels wird daher als ein wichtiger Risikofaktor sowohl für die Entwicklung der sporadischen als auch der familiären Form der spät einsetzenden AD angesehen [Mehta, 2007], ist allerdings keine notwendige Voraussetzung für die Entwicklung der Krankheit [Newman, 2007].

1.1.7.5 Weitere Risikofaktoren

Epidemiologische Studien haben zudem gezeigt, dass Bluthochdruck, kardiovaskuläre Erkrankungen, Hypercholesterolämie, Diabetes, Entzündungen und virale Infektionen signifikant zur Entwicklung und zum Fortschreiten der Alzheimer'schen Erkrankung beitragen können [Stutzmann, 2007; Stozicka, 2007]. Auch schwere Kopfverletzungen, Tumoren und Exposition zu bestimmten Chemikalien (z.B. Pestizide, Schwermetalle) können das Risiko für AD erhöhen [Brown, 2005]. Die Studienergebnisse sind allerdings im Bezug auf einen Zusammenhang zwischen Chemikalien und AD widersprüchlich [Brown, 2005].

1.2 Pathogenese der Alzheimer'schen Erkrankung

In den letzten Jahren wurde deutlich, dass es sich bei AD um eine multifaktorielle Erkrankung mit einer hochkomplexen Pathophysiologie handelt, bei der verschiedene biochemische Systeme beeinflusst sind. Dazu gehören z.B. Veränderungen der cholinergen, glutamatergen, adrenergen, serotoninergen und dopaminergen Neurotransmission, sowie inflammatorische, oxidative und hormonale Prozesse [Mattson, 2004; Zimmermann, 2005]. Das Auftreten von β -Amyloid-Plaques und neurofibrillären Bündeln im Gehirn von Alzheimer-Patienten ist mit Störungen der Calciumhomöostase und entzündlichen Vorgängen wie Aktivierung von Mikroglia, Astrozyten und Komplementfaktoren sowie einer lokalen Erhöhung inflammatorischer Marker (Zytokine, Interleukine, Akute-Phase-Proteine) verbunden [Akiyama, 2000].

Verschiedene Hypothesen zur Pathogenese von AD werden diskutiert:

- Amyloid-Hypothese (s. Kap. 1.2.1)
- Calcium-Hypothese (s. Kap. 1.2.3)
- Cholesterol-Hypothese
- Acetylcholinmangel-Hypothese (s. Kap. 1.3.1.1)

Aufgrund der komplexen und bisher zum großen Teil nicht aufgeklärten Prozesse im Verlauf der Pathogenese der AD können die folgenden Ausführungen auch nur einen kleinen Ausschnitt aus den vielfachen Wechselwirkungen einiger beteiligter Parameter zeigen. Besonderes Augenmerk soll dabei auf eine mögliche Einflussnahme von nicht-steroidalen anti-inflammatorisch wirkenden Substanzen (NSAIDs) gelegt werden.

1.2.1 β -Amyloid (A β), APP und Sekretasen

1.2.1.1 β -Amyloid

Post mortem Untersuchungen der Gehirne von Alzheimer-Patienten zeigten neben intrazellulären Ablagerungen neurofibrillärer Bündel (s. Kap. 1.2.2) große Mengen extrazellulärer Ablagerungen von β -Amyloid (A β), welche auch als senile Plaques bezeichnet werden und als eines der pathologischen Kennzeichen der AD gelten. Golde *et al.* [2002] definierten Amyloid als unlösliches Proteinmaterial mit einer β -Faltblatt-Konformation, welches extrazellulär abgelagert wird.

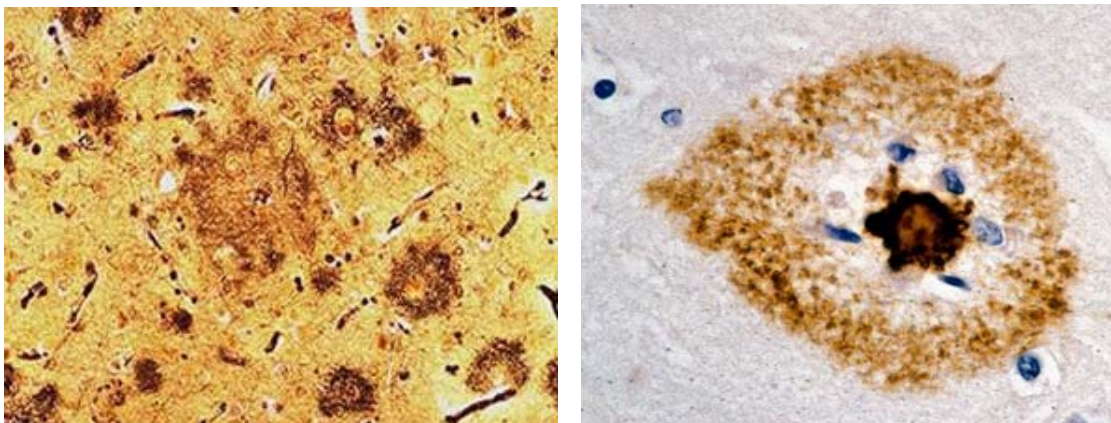


Abb. 1.9: Amyloid-Plaques (Abbildungen aus [Intq 16,17])

Die Entdeckung, dass senile Plaques in Hirngewebe von AD-Patienten hauptsächlich aus verklumptem β -Amyloid-Peptid bestanden, führte zur sogenannten "**Amyloid-Hypothese von AD**", die Hardy und Higgins so formulieren: A β "precipitates to form amyloid and, in turn causes neurofibrillar tangles and cell death" [Hardy, 1992]. A β steht danach im Verdacht die „Amyloid-Kaskade“ zu initiieren, eine Serie von neurotoxischen Ereignissen, welche letztendlich zur Neurodegeneration bei der AD führen.

Histologische Präparationen von Gewebe aus der unmittelbaren Nachbarschaft der senilen Plaques zeigten Astrozyten, Mikroglia und degenerierte Neuriten, die die Plaques umgeben und zum Teil sogar infiltrieren [Zimmermann, 2005]. In Tiermodellen konnten durch Amyloid-Ablagerungen Lern- und Gedächtnisdefizite hervorgerufen werden, wobei die Plaques dieselben Charakteristika aufwiesen wie die der AD [Teraï, 2001]. Allerdings sind weder die pathologischen Konsequenzen von abgelagertem oder gelöstem A β genau geklärt, noch korreliert die Bildung seniler Plaques mit dem Fortschreiten der Demenz [Schmidt, 2006].

Das A β -Protein wurde als normales Produkt des APP-Metabolismus auch in der Zerebrospinalflüssigkeit von gesunden Menschen gefunden [Haass, 1992]. Unter normalen Bedingungen wird es allerdings schneller wieder abgebaut als es unlösliche, extrazelluläre Ablagerungen bildet, die dann zur Aktivierung von Mikroglia und zur Freisetzung entzündungsfördernder Mediatoren führen könnten [Ferencik, 2001].

Zunächst wurde angenommen, dass die fibrillären Ablagerungen von A β die primär **toxische Spezies** darstellten. Mittlerweile haben allerdings eine Reihe von Studien demonstriert, dass andere Spezies stärker pathogen wirken, besonders oligomere Strukturen. Verschiedene dieser Spezies wurden bereits beschrieben, einschließlich „low-n“-Oligomere, ADDLs (A β -derived diffusible ligands) und Protofibrillen [Blurton-Jones, 2006].

Die **neuronale Toxizität von A β** kann auf verschiedenen Mechanismen beruhen. So kann A β durch verstärkte mikrogliale Sekretion inflammatorischer Zytokine wie Interleukin IL-1 und IL-6 inflammatorische Signalwege aktivieren und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch Mikroglia triggern (s. Kap. 1.2.4). Die erhöhte Bildung freier Radikale kann Lipidperoxidation und Zellschädigung verursachen. *In vitro* Versuche zeigen, dass A β_{42} in der Lage ist Apoptose in kultivierten neuronalen Zellen auszulösen, wahrscheinlich durch Veränderungen der Ca-Homöostase (s. Kap. 1.2.3).

Das 4 kDa große A β wird aus einem Vorläuferprotein, dem sogenannten Amyloid-Precursor-Protein (APP), gebildet, welches als integrales Membranprotein durch die Aktion von drei verschiedenen Enzymen, den Sekretasen, gespalten wird. Nur durch die aufeinanderfolgende Spaltung durch die β - und die γ -Sekretase entsteht A β . Die Produktion der A β -Peptide wurde sowohl im Endoplasmatischen Retikulum und Golgi-Apparat als auch, in geringerem Maße, an der Zelloberfläche nachgewiesen [Arbel, 2007; Zhou, 2007]. Der Abbau des Amyloid kann über verschiedene Wege wie z. B. Phagozytose durch Mikroglia erfolgen; einige weitere sind bei Evin *et al.* [2002] beschrieben.

1.2.1.2 APP

Das Amyloid-Precursor-Protein (APP) ist ein ubiquitär exprimiertes integrales Membran-Glycoprotein vom Typ 1, welches bei der Neuroprotektion, synaptischen Transmission, Zelladhäsion und -proliferation, Regulation von Zell/Zell-Interaktionen, Signaltransduktion, beim axonalen Transport oder Neuritenwachstum eine Rolle spielt [Mattson, 1993 a; Evin, 2002; Aslan, 2004; Zhou, 2007]. Es kann in verschiedenen Isoformen (APP₆₉₅, APP₇₅₁ und APP₇₇₀) vorliegen, wobei APP₆₉₅ ausschließlich in Neuronen gebildet wird [Mills, 1999], während die beiden anderen auch in nicht-neuronalen Zellen vorkommen. APP besteht aus einer großen extrazellulären Domäne, einer einzelnen Transmembran-Domäne sowie einem kurzen zytosolischen Teil (s. Abb. 1.10).

Die A β -Region umfasst eine Sequenz von 38-43 Aminosäuren und liegt teilweise in der Transmembran-Domäne [Evin, 2002] (s. Abb. 1.10).

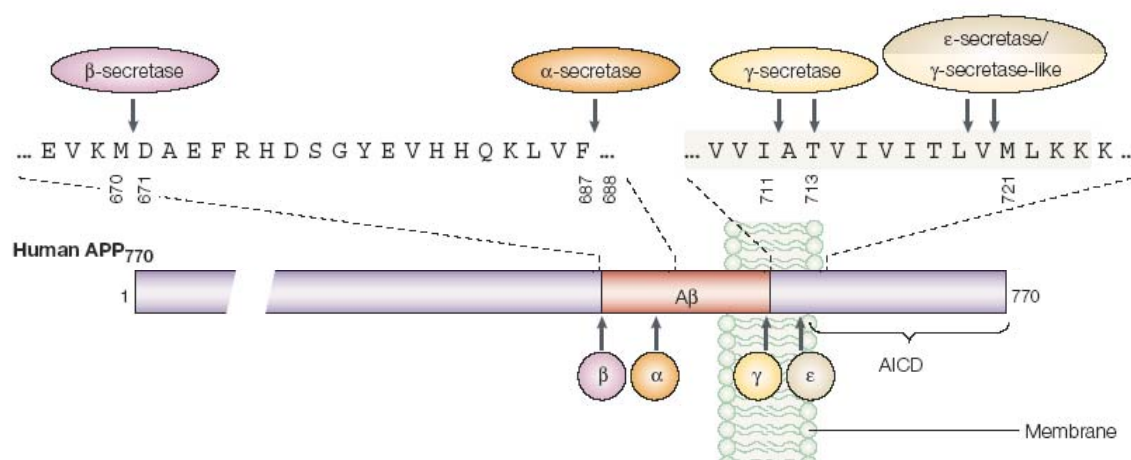


Abb. 1.10: Darstellung von humanem APP₇₇₀ [Sisodia, 2002]

Die Verarbeitung von APP ist ein komplexes, aber normales Ereignis in nahezu allen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen des Körpers [Newman, 2007] und erfolgt durch die Aktivität verschiedener Proteasen, welche als Sekretasen bezeichnet werden. Vereinfacht können am Beispiel von APP₆₉₅ zwei verschiedene Wege unterschieden werden: ein nicht-amyloidogener Weg über α - und γ -Sekretase und ein pathologischer, amyloidogener Weg über β - und γ -Sekretase (s. Abb. 1.11).

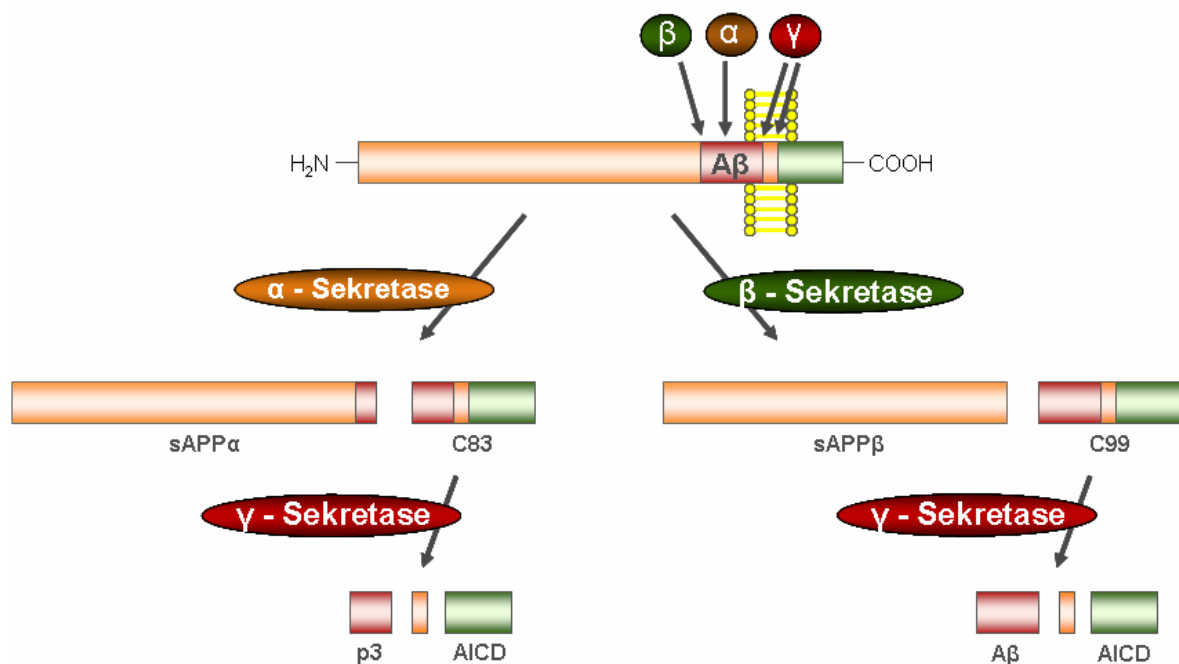


Abb. 1.11: Spaltung von APP durch α -, β - und γ -Sekretase

Die normalerweise überwiegend ablaufende, **nicht-amyloidogene** und damit nicht-pathologische **Spaltung von APP** durch die α -Sekretase erfolgt in der extrazellulären Domäne von APP₆₉₅ nach Lys₆₁₂ innerhalb der Aβ-Sequenz, was die Bildung von leicht aggregierendem Amyloid ausschließt [Esch, 1990; Heese, 2006]. Dabei wird ein lösliches, N-terminales APP-Fragment, bezeichnet als sAPPα (s. Kap. 1.2.1.3 a und 1.2.3), in den extrazellulären Bereich freigesetzt. Das in der Membran verbleibende C-terminale Fragment (C83) kann anschließend von der γ -Sekretase am C-Terminus der Aβ-Sequenz innerhalb der Transmembran-Domäne gespalten werden. Das aus dieser Spaltung resultierende Fragment wird als p3 bezeichnet. Sowohl sAPPα als auch p3 werden in einer Reihe von Zellkulturen und auch im menschlichen Gehirn und der Zerebrospinalflüssigkeit gefunden [Mills, 1999].

Allerdings wird nicht das gesamte APP über den α -Sekretase-Weg abgebaut, alternativ kann die extrazelluläre Domäne des APP auch am Amino-Terminus des A β durch die β -Sekretase gespalten werden, was letztlich zur Freisetzung von intaktem A β führt und daher als **amyloidogener Weg** bezeichnet wird.

Die A β -Sequenz beginnt auf der extrazellulären Seite von APP, 28 Aminosäuren von der Membran entfernt, und reicht 11-15 Aminosäuren weit in die Transmembran-Domäne hinein. Aus der Spaltung des APP₆₉₅ bei Met₅₉₆ durch die β -Sekretase resultiert zunächst ein verkürztes APP-Fragment sAPP β (um 16 Aminosäuren kürzer als sAPP α), das am N-Terminus der A β -Domäne endet [Golde, 1992]. Das Membran-assoziierte verbleibende Fragment C99 enthält die intakte Amyloid-Sequenz, welche nach einer zweiten Spaltung innerhalb der transmembranären Domäne durch die γ -Sekretase am C-Terminus freigesetzt wird [Mills, 1999].

Da die Spaltung der γ -Sekretase nicht regioselektiv erfolgt, ist das entstehende A β heterogen, mit Längen von 38 bis 43 Aminosäuren. Etwa 90 % der gebildeten A β -Peptide sind 40 Aminosäuren lang (A β ₄₀), nur ein kleiner Teil von etwa 10 % besteht aus 42 Aminosäuren (A β ₄₂) [Zimmermann, 2005]. Das Verhältnis der längeren Peptidvariante (A β ₄₂) ist wichtig, da es aufgrund seiner höheren Lipophilie im Vergleich zu A β ₄₀ stärker zur Aggregation neigt und dadurch eine Aggregation von A β ₄₀ beschleunigen kann [Kawahara, 2004]. Es konnte gezeigt werden, dass das hydrophobe Segment in der C-terminalen Region in wässrigen Lösungen unabhängig von pH-Wert und Temperatur eine **β -Faltblattstruktur** ausbildet [Karkos, 2004] (s. auch Kap. 1.3.2.6). Die N-Terminalregion weist dagegen unterschiedliche Eigenschaften bzgl. Konformation und Löslichkeit auf, die von den Milieufaktoren abhängig sind. Diese Aminosäuresequenzen bedingen die Existenz eines dynamischen Gleichgewichtes zwischen α -Helix und β -Faltblattstruktur. Eine Verschiebung des Gleichgewichtes hin zum β -Faltblatt, d.h. eine Konformationsänderung, kann eine Polymerisierung des A β -Peptids sowie die Aggregation zu Fibrillen herbeiführen, wobei der C-Terminus bei der Aggregation eine entscheidende Rolle spielt [Karkos, 2004].

Zusätzlich zur Freisetzung von A β nach Spaltung des C99 durch die γ -Sekretase an den Stellen 40 und 42 der A β -Sequenz, wurden durch dasselbe Enzym Fragmentierungen an 46 und 49, die sogenannten δ - und ϵ -Spaltungen, beobachtet [Mills, 1999]. Bei letzterer entsteht das als **AICD** (APP intracellular domain) bezeichnete Fragment, welches nach Transport in den Zellkern eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription spielen könnte [Mills, 1999; Gao, 2001] (s. auch Kap. 1.2.3).

Neben der Verarbeitung von APP an der Zellmembran [Fahrenholz, 2007] sind vermutlich auch verschiedene intrazelluläre Kompartimente an der Generation von A β beteiligt. Wie es scheint, unterliegt APP in einigen Zellsystemen einer **Internalisierung** von der Zelloberfläche, wobei verschiedene Studien die A β -Produktion dem zellulären sekretorischen System, also dem trans-Golgi-Apparat oder dem Endoplasmatischen Retikulum zuordnen [Zimmermann, 2005] (s. Kap. 1.2.1.3 b.).

Eine Verlagerung der APP-Spaltung in Richtung des nicht-amyloidogenen Weges über die α -Sekretase könnte einen amyloidsenkenden Effekt ausüben.

1.2.1.3 Sekretasen

a.) α -Sekretase:

Die Spaltung des APP durch die α -Sekretase zerstört die A β -Sequenz und verhindert damit die Freisetzung und nachfolgende Aggregation des A β -Peptids zu senilen Plaques. Dieser Weg dominiert in den meisten Zelltypen [Evin, 2002] und erfolgt hauptsächlich in der Plasmamembran, aber auch im trans-Golgi-Apparat [Lammich, 1999] und Endoplasmatischem Retikulum [Vincent, 2008].

Für drei Enzyme aus einer Familie Zink-abhängiger Metalloproteasen, der sogenannten „Disintegrin und Metalloproteasen“ (**ADAMs**), wurde α -Sekretase-Aktivität nachgewiesen: ADAM 10 und ADAM 17 (auch bekannt als TNF α -verarbeitendes Enzym), sowie wahrscheinlich auch ADAM 9 [Zimmermann, 2005]. Individuelle knockouts dieser

Proteasen führten in keinem Fall zum kompletten Ausfall der α -Sekretase-Aktivität, was daraufhin deutet, dass sich die verschiedenen ADAMs gegenseitig kompensieren [Postina, 2008].

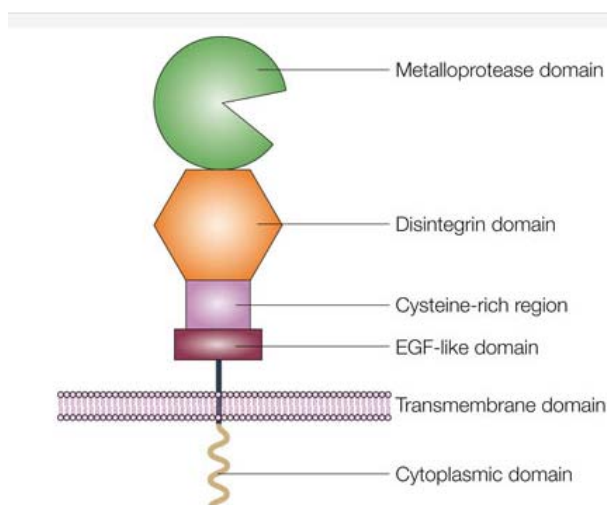
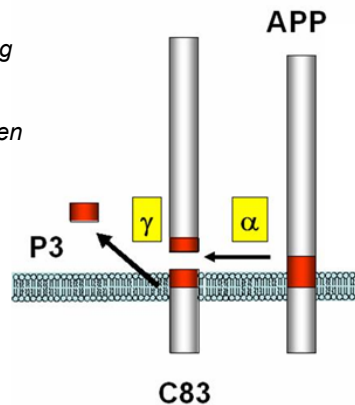


Abb. 1.12: Schematischer Aufbau der α -Sekretase (Abb. aus [Intq 18])

ADAMs sind Typ 1 integrale Membranproteine und bestehen aus einer N-terminalen Signalsequenz (wichtig für den Transport durch den sekretorischen Apparat) und einer Prodomäne, auf welche unmittelbar

das aktive Zentrum des Enzyms folgt. Eine Aktivität der Protease ist allerdings erst nach Entfernung der Prodomain und anschließender Koordination der Metalloprotease-Region mit Zink möglich. An der C-terminalen Seite der Metalloprotease-Domäne schließen sich eine Disintegrin-Domäne, eine Cystein-reiche Region, eine hydrophobe Transmembrandomäne sowie ein kurzer zytoplasmatischer Abschnitt an [Vincent, 2004].

Abb. 1.13: Spaltung von APP auf dem nicht-amyloidogenen Weg (Abb. nach [Intq 19])



Durch die Aktivität der α -Sekretase entsteht während der Verarbeitung von APP neben einem C83-Fragment ein lösliches N-terminales Fragment, das sogenannte sAPP α , welches in den Extrazellulärraum freigesetzt wird.

In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass **sAPP** sowohl Einfluss auf die neuronale Zellvitalität als auch auf adhäsive Interaktionen, neuronales Zellwachstum, Synaptogenese und synaptische Plastizität ausübt [Mattson, 1997; Postina, 2008]. Weiterhin hat es Effekte auf verschiedene Signaltransduktionswege und Ionenbewegungen einschließlich die Regulation der intraneuralen Calciumkonzentration [Mattson, 1997] (s. Kap. 1.2.3). Für sAPP α sind die Aktivierung von NF- κ B und Veränderungen verschiedener second-Messenger (z.B. cGMP) und Proteinkinase C (PKC) beschrieben [Mills, 1999]. In einer Studie zur Neuroprotektion von hippocampalen Neuronen gegen Exzito- und A β -induzierte Toxizität war sAPP α etwa 100mal wirksamer als sAPP β , was auf eine neuroprotektive Rolle für sAPP α hinweist [Postina, 2008].

Beeinflussung der α -Sekretase-Aktivität:

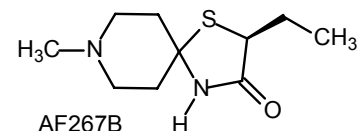
Die Aktivität der α -Sekretase kann über verschiedene **Signalkaskaden** wie Phospholipase C, Phosphatidylinositol-3-kinase und Serin/Threonin-spezifische Kinasen (z.B. Proteinkinase C) reguliert werden [Postina, 2008]. So kann durch Stimulation verschiedener G-Protein-gekoppelter Rezeptoren und einer direkten Aktivierung der **Proteinkinase C** eine gesteigerte Verarbeitung von APP über den α -Sekretase-Weg erreicht werden [Hung, 1993]. Avramovich *et al.* [2002] konnten anhand von Versuchen an humanen Neuroblastoma-Zellen beobachten, dass NSAIDs wie Ibuprofen und Indometacin über eine Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade und Proteinkinase C den nicht-amyloidogenen sAPP α -Weg stimulieren können. Viele weitere Faktoren wie

Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren, Zytokine und Hormone beeinflussen ebenfalls die Aktivität der α -Sekretase [Evin, 2002].

Obwohl klinische Studien bisher mit eher negativem Resultat verliefen [Vincent, 2004], können physiologische Mengen an **Östrogen** und **Testosteron** in neuronalen Zellen den nicht-amyloidogenen α -Sekretase-Weg aktivieren und damit die A β -Produktion hemmen [Xu, 1998], was den Ausbruch und das Risiko von AD vermindern würde. Dies würde epidemiologisch nachweisbare positive Effekte einer Hormonersatztherapie bestätigen (s. Kap. 1.3.2.3).

Weiterhin reagiert die α -Sekretase-Aktivität sensibel auf **Membrancholesterol**-Veränderungen und kann durch Cholesterol-Reduktion erhöht werden [Kojro, 2001]. Dieser Effekt könnte mit einer erhöhten Membranfluidität, erhöhter Beweglichkeit von APP und α -Sekretase in der Membran und/oder verminderter Internalisierung von APP zusammenhängen [Kojro, 2001]. Kojro *et al.* konnten nach Behandlung mit dem Lipidesenker Lovastatin in verschiedenen neuronalen Zelltypen eine erhöhte Freisetzung von sAPP α und eine gesteigerte Expression und Aktivität der α -Sekretase feststellen. Dies bestätigt die Beobachtungen von Jick *et al.* [2000], dass Patienten unter Behandlung mit Lipidsenkern ein vermindertes Risiko für AD besitzen. Die Korrelation zwischen einer Cholesterol-Reduktion, der Hochregulierung der ADAM 10 - Expression und einer erhöhten sAPP α -Sekretion deutet auf einen Zusammenhang zwischen lipidsenkenden Verbindungen und dem α -Sekretase-Weg hin.

Studien von Nitsch *et al.* [1992] zeigten, dass eine **Stimulation muscarinerger Acetylcholin-Rezeptoren** (mAChR) vom Typ 1 und 3 sowie nachfolgende Aktivierung der PKC eine erhöhte Spaltung von APP auf dem α -Sekretase-Weg und damit eine gehemmte Produktion von A β nach sich ziehen kann. Der spezifische M1-mAChR-Agonist AF267B zeigte in einem Modell mit transgenen Mäusen sowohl reduzierte A β - und Taupathologien als auch eine Verbesserung kognitiver Defizite der Versuchstiere [Fahrenholz, 2007; Postina, 2008]. Die Effekte von Acetylcholinesterase-Hemmern könnten ebenfalls über eine indirekte Hochregulierung des α -Sekretase-Weges durch Stimulation muskarinerger Acetylcholinrezeptoren vermittelt werden [Vincent, 2004].



Auch die glutamaterge **Stimulation bestimmter Glutamat-Rezeptor-Subtypen** führte über PKC zu einer verstärkten sAPP α -Freisetzung in HEK-Zellen, was durch einen spezifischen PKC-Inhibitor gehemmt werden konnte [Mills, 1999].

Die **intrazelluläre Calciumkonzentration** beeinflusst ebenfalls die Aktivität der α -Sekretase [Mills, 1999] (s. Kap. 1.2.3).

Eine Aktivierung der α -Sekretase und damit des nicht-amyloidogenen Weges könnte günstige Auswirkungen auf den Ausbruch und das Fortschreiten von AD besitzen, da aus dieser Strategie eine Verminderung der Produktion von neurotoxischem A β -Peptid bei gleichzeitig gesteigerter Bildung von neuroprotektivem sAPP α resultieren würde.

b.) β -Sekretase:

Die β -Sekretase ist das limitierende Enzym für die A β -Produktion und wurde als ein transmembranäres Typ 1 – Membranglycoprotein aus der Pepsin- und Renin-Familie der Aspartyl-Proteasen identifiziert [Dewachter, 2002]. Verschiedene Namen sind für das Enzym etabliert wie **BACE** (β -site APP-cleaving enzyme), Memapsin 2 (MEMbrane Aspartic Protease of the pepSIN family) und Asp-2 (aspartic protease). BACE 1 wird in verschiedenen Organen einschließlich dem Gehirn und von vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert. Ein weiteres humanes Homologes, die BACE 2, findet man besonders im Herzen, den Nieren und der Plazenta, allerdings wenig im Gehirn, was darauf schließen lässt, dass BACE 1 die vorherrschende Form der β -Sekretase in Neuronen darstellt [Cai, 2001].

Dieses Enzym spaltet APP zwischen Met₆₇₁ und Asp₆₇₂ und erzeugt so das N-terminale Ende der **A β -Sequenz** [Sisodia, 2002] (s. Abb. 1.14). Die Spaltung erscheint sequenz-spezifisch [Zimmermann, 2005] und führt nach weiterer Spaltung durch die γ -Sekretase zur Freisetzung von A β -Peptiden verschiedener Länge. Ob dies die normale physiologische Aufgabe der β -Sekretase darstellt, ist nicht bekannt [Cai, 2001]. Untersuchungen an Hirngewebe zeigten, dass die BACE 1 - Expression im Gehirn von Alzheimer-Patienten erhöht ist [Fukumoto, 2002; Holsinger, 2002; Yang, 2003].

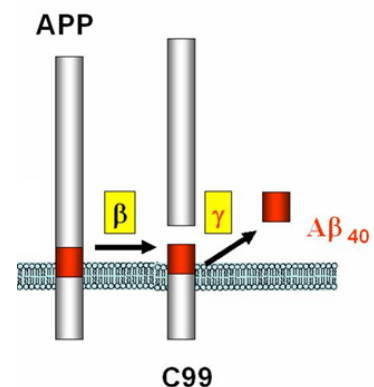


Abb. 1.14: Spaltung von APP auf dem amyloidogenen Weg (Abb. nach [Intq 19])

Die β -Sekretase spaltet APP mit der „Schwedischen Mutation“ (s. Kap. 1.1.7.4) wesentlich effizienter als beim Wildtyp [Vassar, 2002], was zu einer erhöhten A β -Produktion führen kann.

β -Sekretase-Aktivität findet sich in der Mehrheit der Zellen und Gewebe des menschlichen Körpers, allerdings wird die maximale Aktivität in neuralem Gewebe und neuronalen Zellenlinien gefunden [Vassar, 2002]. Die Aktivität der β -Sekretase ist am höchsten bei einem schwach sauren pH-Wert von etwa 3,5 – 4,5 in den Kompartimenten des sekretorischen Signalweges einschließlich des Golgi-Apparates, des trans-Golgi-Netzwerks, sekretorischer Vesikel und des Endoplasmatischen Retikulums, was auf eine Lokalisierung der aktiven Seite des Enzyms innerhalb des Lumens der sauren intrazellulären Kompartimente schließen lässt [Vassar, 2002].

BACE 1 und APP sind beide präsent an der Zelloberfläche, wo das Enzym allerdings aufgrund des neutralen pH-Wertes nur eine geringe Aktivität zeigt [Tang, 2005]. Die anschließende **Internalisierung** von APP und BACE 1 z. B. in frühe Endosomen ist daher fundamental für den Mechanismus der intrazellulären A β -Produktion. Dort ermöglicht nach Co-Lokalisierung von Enzym und Substrat, das saure Milieu die Hydrolyse des APP [Arbel, 2007]. (Eine beginnende Spaltung des APP bereits während des Transports in den Transportvesikeln ist ebenso möglich.) Das Enzym wird anschließend über den Golgi-Apparat wieder recycelt und erneut zur Zellmembran transportiert. Das C-terminale Fragment von APP kann anschließend ebenfalls zurück zur Zellmembran, ins ER oder den Golgi-Apparat transportiert werden, wo die zweite Spaltung durch die γ -Sekretase erfolgt, die zur Freisetzung von A β führt [Ghosh, 2002].

BACE 1 – knockout - Mäuse erwiesen sich bei fehlender Produktion von A β als gesund, waren fertil und zeigten keine Verhaltensunterschiede und Gewebeveränderungen im Vergleich zum Wildtyp [Cai, 2001; Luo, 2001; Roberds, 2001], was darauf hindeuten könnte, dass eine Behandlung mit BACE 1 - Inhibitoren eventuell keine schweren Nebenwirkungen nach sich zieht.

Beeinflussung der β -Sekretase-Aktivität:

Die Expression von BACE 1 kann über verschiedene Faktoren moduliert werden. Sastre *et al.* [2003, 2006 a] konnten z.B. zeigen, dass BACE 1 - mRNA, -Protein-Level und -Aktivität in Neuroblastomazellen durch pro-inflammatorische Mediatoren erhöht wurden. Dieser Effekt konnte jedoch durch Behandlung mit bestimmten NSAIDs und PPAR γ -

Agonisten wieder rückgängig gemacht werden. Beide scheinen in der Lage zu sein über eine Aktivierung des **PPAR γ** (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) die Gen-Promotor-Aktivität und damit die Transkription der β -Sekretase zu hemmen (s. Abb. 1.16). PPAR γ -agonistische Wirkung zeigen neben Indometacin z.B. **NSAIDs** wie Ibuprofen [Lehmann, 1997], aber auch die NO-freisetzenden Derivate des Flurbiprofen, HCT 1026 und NXC-2216 (s. Kap. 1.4) [Bernardo, 2005, 2006 a, 2008], während bei ASS und Paracetamol keine derartigen Effekte nachgewiesen werden konnten und die auch keine Verminderung der Gen-Promotor-Aktivität der BACE 1 zeigten [Sastre, 2006 b]. Die Reduktion der A β -Bildung und die damit einhergehenden protektiven Effekte bestimmter NSAIDs könnten daher möglicherweise mit einer Aktivierung des PPAR γ zusammenhängen [Heneka, 2001 b; Sastre, 2006 a,b].

Nukleare Rezeptoren wie PPAR sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Lipid- und Kohlenhydrat-Metabolismus [Lemberger, 1996]. PPAR γ ist z.B. beteiligt an der Differenzierung von Adipozyten, der Regulation der Expression bestimmter Enzyme, der Glucose-Homöostase, Insulin-Sensitivität und Zellproliferation [Lemberger, 1996; Jaradat, 2001; Camacho, 2004] und wird besonders in Adipozyten und in Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten und Makrophagen exprimiert [Bernardo, 2008]. Im Gehirn findet man ihn z.B. in Mikroglia, Astrozyten und Neuronen, wobei dort seine prinzipielle Aufgabe darin besteht, die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, TNF α und IL-6 zu unterdrücken [Jiang, 1998; Ricote, 1998; Combs, 2000].

Der PPAR γ wird z.B. durch ungesättigte Fettsäuren, endogene (15d-PGJ₂) und synthetische Agonisten wie Thiazolidindione (TZDs, Glitazone) sowie einige NSAIDs aktiviert und kann anschließend durch Bindung bestimmter Sequenzen seiner Promotorregion die Expression pro-inflammatorischer Gene kontrollieren [Bernardo, 2008].

Alternativ kann PPAR γ die Expression spezifischer Gene (z.B. der iNOS (mit Einfluß auf die NO-Produktion) und der COX-2) auch ohne eine direkte Bindung an den Gen-Promotor unterbinden, weil eine Hemmung ebenfalls über eine sogenannte Transrepression, d.h. antagonisierende Wirkung auf andere Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, erreicht werden kann [Li, 2000 a; Ricote, 1998, 2007; Landreth, 2001] (s. Abb. 1.16). PPAR blockiert dabei z.B. die Fähigkeit von **NF- κ B** mit dem Promotor zu interagieren, inhibiert den Zusammentritt zu einem funktionierenden Transkriptionskomplex oder inaktiviert den Komplex durch Bindung mit Co-Repressorkomplexen [Landreth, 2007].

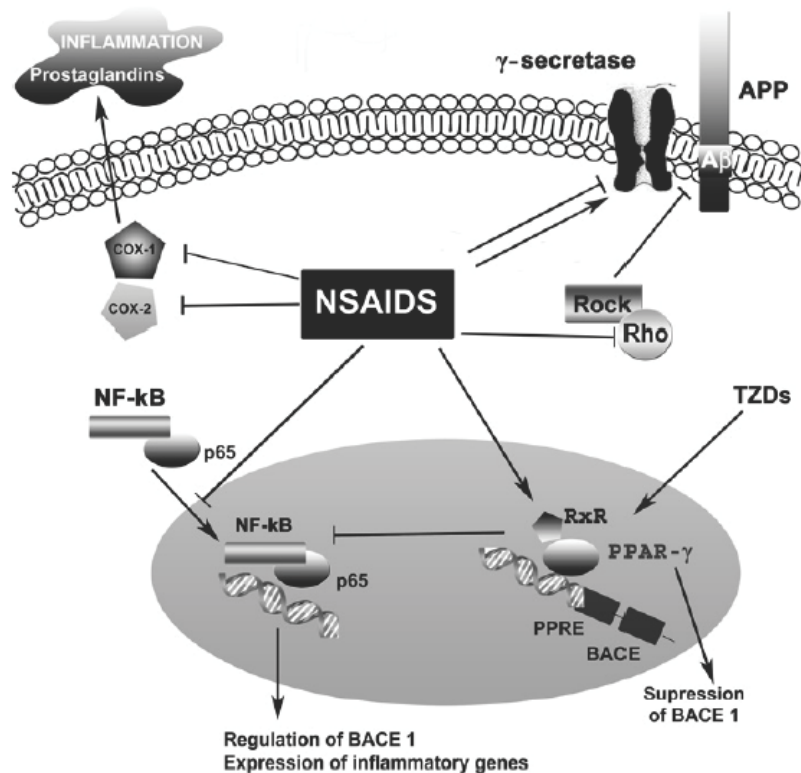


Abb. 1.16: Molekulare Targets von NSAIDs (Abb. aus [Lleó, 2007])

Über eine Aktivierung des PPAR γ und damit indirekte Hemmung von NF- κ B sind **NSAIDs** wie Ibuprofen und andere Agonisten (z.B. Glitazone) in der Lage z. B. die Transkription der iNOS zu unterdrücken [Heneka, 2000; Landreth, 2001] (s. Abb. 1.16 und Kap. 1.2.4), was mit einer geringeren Apoptose der Zellen einhergeht. Für NSAIDs wie Flurbiprofen und Indometacin wurde weiterhin eine direkte Hemmung der Translokation von NF- κ B in den Zellkern und damit eine Verminderung der Transkription pro-inflammatorischer Gene gezeigt [Lleó, 2007] (s. Abb. 1.16).

β -Amyloid-Peptide sind in der Lage inflammatorische Vorgänge durch Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten zu triggern, welche daraufhin vermehrt **Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies und Neurotoxine** freisetzen können [Combs, 1999, 2000; Sastre, 2003]. Diese Entzündungsmediatoren könnten in der Folge zunehmend die BACE-Expression hochregulieren und dadurch zu einer gesteigerten Produktion von entzündungsförderndem A β beitragen.

PPAR γ -Aktivierung durch PPAR γ -Agonisten (z.B. Ibuprofen) hemmt die A β -stimulierte Aktivierung von Mikroglia und damit deren Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6, TNF α und könnte so zu einer Verminderung der Toxizität von A β beitragen [Combs, 2000, 2001]. Combs *et al.* [2000] konnten zudem zeigen, dass

PPAR γ -Liganden einer Erhöhung der A β -stimulierten Expression der COX-2 in Mikroglia und Monozyten entgegenwirken können (s. Kap. 1.2.4).

Bestimmte Kombinationen von inflammatorischen **Zytokinen** können allerdings die PPAR γ mRNS-Level in neuronalen Zellen vermindern [Sastre, 2006 a,b], was im Gehirn von AD-Patienten und in transgenen Mäusen bereits beobachtet wurde. Nach kürzlich veröffentlichten Ergebnissen findet sich im Gehirn von Alzheimer-Patienten eine 40%ige Reduktion der PPAR γ -Protein-Level im Vergleich zur Kontrollgruppe [Sastre, 2006 a]. Da PPAR γ als transkriptionaler Suppressor der BACE 1 fungiert (s. Abb. 1.16), hat eine reduzierte Expression von PPAR γ eine erhöhte Gen-Promotor-Aktivität und damit eine erhöhte Transkription von BACE 1 zur Folge, was wiederum zu einer Verstärkung des amyloidogenen Verarbeitungsweges von APP führen würde [Sastre, 2003, 2006 a,b]. Erhöhte Konzentration von A β kann über eine Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten durch Freisetzung inflammatorischer Zytokine entzündliche Prozesse verstärken, die wiederum eine Senkung der PPAR γ -Aktivität und eine Steigerung der BACE-Expression bewirken würden – ein zweiter Teufelskreis. Dies könnte die Überexpression der BACE im Gehirn unter inflammatorischen Bedingungen erklären und die Theorie bestätigen, dass Entzündungsvorgänge signifikant zur Pathogenese von AD beitragen [Sastre, 2006 a,b].

Es konnte gezeigt werden, dass bestimmte **NSAIDs** in der Lage sind, die Transkription und damit die Level von PPAR γ in Adipozyten und Neuronen zu erhöhen [Sastre, 2006 a,b].

c.) γ -Sekretase

Die γ -Sekretase gehört zu einer Familie von Proteasen, die eine Spaltung von Peptidbindungen innerhalb des Lipidbilayer bewirken [Lundkvist, 2007]. Im Unterschied zu anderen Enzymen dieser Familie handelt es sich bei der γ -Sekretase allerdings um einen großen Protein-Komplex aus mindestens vier verschiedenen, integralen Membranproteinen: Presenilin (PS), Nicastrin (NCT), Anterior Pharynx Defective-1 (Aph-1) und Presenilin Enhancer-2 (PEN-2). Alle vier Bestandteile werden für die proteolytische Aktivität benötigt, wobei die PS-Proteine das aktive Zentrum des Enzyms zu enthalten scheinen [Weggen, 2003 b; Czirr, 2006].

Preseniline sind polytopische Membranproteine, die nach dem derzeit akzeptierten Modell die Membran 9 mal durchziehen [Wolfe, 2006]. Sie entstehen aus einem Vorläuferprotein durch endoproteolytische Spaltung zwischen der 6. und der 7. transmembranären Domäne innerhalb der großen intrazellulären Schleife und bilden ein N-terminales (NTF) und ein C-terminales Fragment (CTF), die zueinander assoziiert verbleiben [Steiner, 2004]. Die Preseniline enthalten in den transmembranären Domänen 6 und 7

jeweils eine Asparaginsäure, bei welchen sich das aktive Zentrum des Enzyms befinden könnte [Tandon, 2002]. Diese Entdeckung legt die Vermutung nahe, dass es sich bei PS um eine Aspartylprotease handelt [Wolfe, 2006].

PS werden hauptsächlich in den Membranen des Endoplasmatischen Retikulums und trans-Golgi-Netzwerkes, daneben aber auch in der Zellmembran und in den Endosomen gefunden [De Strooper, 1997; Dewachter, 2002; Chyung, 2005], wobei die γ -Sekretase-vermittelte Spaltung von APP wahrscheinlich ebenfalls intrazellulär erfolgt [Pasternak, 2003; Tarassishin, 2004]. PS sind in verschiedene Signalwege in der Zelle einbezogen und spielen eine wichtige Rolle während der Entwicklung, aber auch bei apoptotischen Vorgängen, weiterhin regulieren sie den Transport von Membranproteinen [Newman, 2007].

Die genaue Bedeutung der anderen Komponenten ist derzeit noch im Focus intensiver Forschungen. Ein möglicher Mechanismus für den Zusammentritt des γ -Sekretase-Komplexes und seine Interaktion mit einem Substrat wie z.B. APP ist bei Wolfe [2006] beschrieben. So vermutet man für **Nicastrin** eine Funktion in der Stabilisierung der PS und deren Transport vom Endoplasmatischen Retikulum zur Zelloberfläche [Li, 2003 a; Evin, 2006]. Der große extrazelluläre Teil von Nicastrin scheint essentiell für die

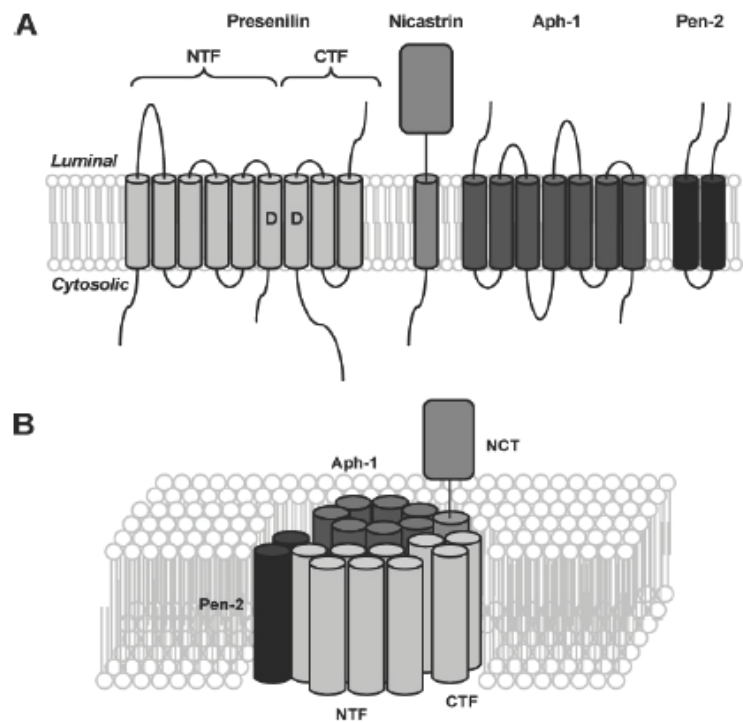


Abb. 1.17: A.) Bestandteile des γ -Sekretase-Komplexes; B.) Modell einer möglichen Anordnung der Komponenten in der γ -Sekretase [Wolfe, 2006]

Substraterkennung und die Endoproteolyse von PS zu sein, während das 7-fach transmembranäre **Aph-1** wahrscheinlich als Gerüstprotein zur Stabilisierung des Komplexes dient [Takasugi, 2003; Wolfe, 2006]. **PEN-2** scheint als Cofaktor zu fungieren, der für den finalen Schritt der Aufnahme von Presenilin in den γ -Sekretase-Komplex und die anschließende Endoproteolyse und Aktivierung des Enzyms bedeutsam ist [Takasugi, 2003; Capell, 2005]. Zusätzlich wurde entdeckt, dass das Membranprotein **CD147** einen regulatorischen Effekt auf die γ -Sekretase-Aktivität ausübt, und dieses als eine regulatorische Untereinheit des Enzyms eingestuft [Zhou, 2005]. Weitere Untersuchungen zur Stöchiometrie, zum Aufbau und zur Funktionsweise des γ -Sekretase-Komplexes sind im Gange.

Das Enzym hat nur geringe Sequenzspezifität (s. Kap. 1.2.1.2), was sich z.B. im Entstehen von A β -Peptiden verschiedener Längen äußert, diejenigen mit 40 bzw. 42 Aminosäuren stellen die am besten untersuchten dar [Weggen, 2003 a].

Die γ -Sekretase ist allerdings nicht nur an der Verarbeitung von APP beteiligt, sondern auch von einer Reihe weiterer Typ 1 - Membranproteine wie z.B. **NOTCH**, ErbB4 und etwa 25 anderen Substraten [Uemura, 2004; Lleó, 2007]. Unter den bisher identifizierten Substraten spielt NOTCH eine besonders wichtige Rolle. Ähnlich dem APP, unterliegt es einer intramembranären Spaltung durch die γ -Sekretase, was in der Freisetzung der intrazellulären Domäne, genannt NICD (NOTCH intracellular domain), resultiert, welche anschließend von der Membran in den Zellkern „wandert“ und dort als Transkriptionsfaktor für die Zelldifferenzierung von der Embryogenese bis in hohe Alter hinein bedeutsam ist [Steiner, 2004]. Steiner vermutet daher, dass die normale Funktion der γ -Sekretase in der Signaltransduktion zum Zellkern mittels der Freisetzung der ICDs aus der Membran liegen könnte.

Eine unselektive Hemmung der γ -Sekretase und damit der Produktion von NICD führte in Versuchen an transgenen Mäusen zu Störungen der Hämatopoese und schweren gastrointestinalen Nebenwirkungen [Behr, 2005].

Beeinflussung der γ -Sekretase-Aktivität:

Für verschiedene Faktoren und Prozesse wurde eine Beeinflussung der γ -Sekretase-Aktivität beschrieben. Dazu gehören der Zusammentritt des γ -Sekretase-Komplexes und seine Aktivierung, die regulatorische Untereinheit CD147, vorübergehende und schwache Bindungspartner wie GSK-3 (s. Kap. 1.2.2), inflammatorische Zytokine, sowie Cholesterol- und Sphingolipid-Level.

Takashima *et al.* [1998] berichten, dass **GSK-3 β** und Tau an dieselbe Region von PS1 binden, was die Vermutung zulässt, dass PS1 die Interaktion von Tau und GSK-3 β regulieren könnte (s. Kap. 1.2.2). Umgekehrt ließe das den Schluss zu, dass GSK-3 über eine Bindung an die PS der γ -Sekretase die Regulation der A β -Produktion beeinflussen könnte [Zhou, 2007].

Auch wenn der zugrunde liegende Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, so scheint **Cholesterol** infolge seines Einflusses auf die physikalischen Eigenschaften von Lipid-Bilayern in die Regulation der γ -Sekretase-Aktivität einbezogen zu sein [Zhou, 2007]. γ -Sekretase-Komplexe wurden größtenteils in sogenannten „lipid rafts“ gefunden [Vetrivel, 2004; Urano, 2005; Wahrle, 2006], bei welchen es sich um kurzlebige Membranmikrodomänen handelt, die angereichert sind mit Cholesterol und Sphingolipiden und von denen man glaubt, dass sie als metastabile Plattformen dem Zusammentritt bestimmter Proteine dienen können. Diese Cluster könnten dann verschiedene physiologische Prozesse wie intrazelluläres „membrane trafficking“, Signaltransduktion, Immunantwort und Apoptose ausführen [Dykstra, 2003; Zhou, 2007]. Basierend auf den Ergebnissen von Vetrivel *et al.* [2004], Urano *et al.* [2005] und Wahrle *et al.* [2006] ist es wahrscheinlich, dass die γ -Sekretase-Aktivität hauptsächlich in solchen „lipid rafts“ stattfindet, deren physikochemische Eigenschaften vom Cholesterolgehalt abhängig sind. Biochemische Studien an kultivierten Zellen und im transgenen Mausmodell zeigten, dass Cholesterolsynthese-Inhibitoren eine drastische Reduktion der A β -Peptid-Synthese verursachen können [Refolo, 2001; Fassbender, 2001; Ehehalt, 2003]. Dies würde einige klinische Studien bestätigen, die Patienten unter Statin-Behandlung ein geringeres Alzheimer-Risiko zusprechen als der normalen Bevölkerung [Jick, 2000; Austen, 2002], wobei andere Studien gemischte Ergebnisse zeigten [Zhou, 2007]. Eine Beeinflussung der Membran-Cholesterol-Level besteht über ApoE4, wahrscheinlich über die Veränderung der Lipoprotein-Partikel-Zusammensetzung [Zhou, 2007]. Das ApoE4-Allel stellt daher einen wichtigen Risikofaktor für AD dar (s. Kap. 1.1.7.4).

Die Entwicklung selektiver Inhibitoren der A β ₄₂-Bildung erscheint vor dem Hintergrund der großen Anzahl verschiedener Substrate der γ -Sekretase notwendig. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass bestimmte nicht-steroidale, anti-inflammatorische Substanzen (**NSAIDs**) wie z.B. Ibuprofen, Indometacin, Sulindac und Flurbiprofen die Fähigkeit besitzen in Zellkulturexperimenten und in Tierversuchen die Aktivität der γ -Sekretase dahingehend zu modulieren, dass die Produktion des längeren A β ₄₂-Peptides zu kürzeren Varianten wie dem A β ₃₈ hin verschoben wurde. Diese Fähigkeit steht nicht im Zusammenhang mit der COX-Inhibition der Substanzen, wie Weggen *et al.* [2001] auch an anderen Beispielen beweisen konnten: trotz vorhandener COX-Inhibition zeigten z.B. Naproxen und ASS keinerlei A β -senkende Wirkung. Zudem konnte bei einigen NSAID-Derivaten ohne COX-Aktivität eine Verminderung der A β -Bildung festgestellt werden [Moriyama, 2002; Eriksen, 2003]. R-Flurbiprofen bewirkt z.B. *in vitro* eine seinem S-Enantiomer vergleichbare Senkung der A β ₄₂-Produktion ohne allerdings die Wirkung auf die COX und damit die potentiellen Nebenwirkungen zu teilen [Weggen, 2001]. Erstaunlich war die Beobachtung, dass selektive COX-2-Hemmer wie Celecoxib sogar eine Erhöhung der A β ₄₂-Produktion initiierten [Gasparini, 2004; Kukar, 2005].

Bemerkenswerterweise konnte bei NSAIDs, die die A β ₄₂-Produktion vermindern, innerhalb bestimmter Dosisbereiche keine Beeinflussung der Verarbeitung von NOTCH und der anderer Substrate der γ -Sekretase festgestellt werden [Czirr, 2006]. Ferner verändern die jeweiligen A β -senkenden NSAIDs weder die APP-Expression, Verarbeitung, Internalisierung oder Freisetzung der extrazellulären Domäne bzw. AICD-Generierung, noch führen sie wie andere γ -Sekretase-Inhibitoren zur Ansammlung C-terminaler Fragmente von APP [Moriyama, 2002; Weggen, 2001, 2003 b; Gasparini, 2004; Lleó, 2004]. Einige Nebenwirkungen können somit vermieden werden.

Der genaue Wirkungsort der NSAIDs ist letztlich noch nicht bekannt. Da die proteolytische Aktivität der γ -Sekretase allerdings auch am isolierten Enzymkomplex beobachtet wurde, ist eine direkte Modulation der Enzymaktivität durch allosterische Bindung des entsprechenden NSAIDs an die γ -Sekretase, an einer vom aktiven Zentrum des Presenilins verschiedenen Stelle am wahrscheinlichsten [Weggen, 2001, 2003 a,b; Behr, 2004; Wolfe, 2006]. Eine damit einhergehende Konformationsänderung des Enzymkomplexes könnte zu einer veränderten Orientierung des APP zum katalytischen Zentrum des Enzyms und damit veränderten Spaltungsverhalten hin zu kürzeren A β -Varianten führen [Lleó, 2004; Czirr, 2006] (s. Abb. 1.18). Zur Zeit ist allerdings noch unbekannt wo NSAIDs an den Protease-Komplex binden [Wolfe, 2007].

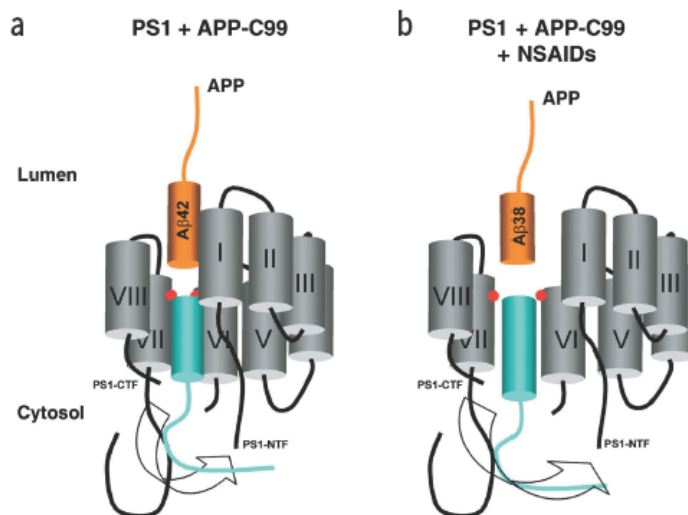


Abb. 1.18: Modell einer möglichen Beeinflussung der PS1-Konformation durch NSAIDs: a.) Presenilin 1 ist gezeigt als ringartige Struktur, welche APP C99 an den beiden Aspartatresten (rot) in den Transmembrandomänen VI und VII spaltet und so Aβ₄₂ freisetzt; b.) Bei Anwesenheit von NSAIDs erhöht sich die Entfernung zwischen den CTF und NTF von PS1. Diese Konformationsänderung verschiebt die Spaltung von APP C99 zu kürzeren Spezies wie Aβ₃₈ [Lleó, 2004]

Über 150 **Mutationen** in den PS-Genen sind bekannt, welche für die Mehrheit der familiären Formen von AD verantwortlich sind und wovon fast alle zu einer erhöhten Produktion von Aβ₄₂ führen [Golde, 2000]. Diese Mutationen könnten zu geringfügigen Konformationsänderungen der PS-Proteine im γ-Sekretase-Komplex führen und auf diese Weise das Spaltungsverhalten des Enzyms und damit die Stöchiometrie der gebildeten Aβ-Peptide beeinflussen. NSAIDs könnten nun die γ-Sekretase-Aktivität in einer ähnlichen, der Mutation entgegengesetzten Weise modifizieren und damit deren Effekt wieder ausgleichen [Czirr, 2006]. Durch selektive Verminderung der Aβ-Produktion könnte auf diese Weise, z.B. im Falle einer FAD mit früh eintretendem Krankheitsbeginn, eine Verzögerung des Ausbruchs der Krankheit erreicht werden.

Der klinische Wert einer Einnahme von NSAIDs zur Senkung der Aβ₄₂-Produktion wird allerdings durch die bei einer Langzeiteinnahme nachgewiesenen, signifikanten gastrointestinalen sowie renalen Nebenwirkungen limitiert [Gasparini, 2005]. Es werden jedoch verschiedene Strategien zur Verbesserung des Nebenwirkungsprofils unternommen (s. Kap. 1.4).

1.2.2 Tau

Eine große Zahl von Erkrankungen des Gehirns, die sogenannten Tauopathien zu denen auch die Alzheimer'sche Erkrankung, Morbus Pick sowie die frontotemporale Demenz mit Parkinson gehören, sind verbunden mit der Aggregation von Tau-Protein.

Neurofibrilläre Bündel (neurofibrillar tangles, **NFT**) sind intrazelluläre Aggregate von gepaarten, helikalen Filamenten (paired helical filaments, **PHFs**) und „straight filaments“, deren Hauptkomponente das Microtubuli-assoziierte Tau-Protein ist, hier allerdings in hyperphosphorylierter Form [Mi, 2006].

Es scheint eine Korrelation zwischen der Menge an NFT und dem Ausmaß der Demenz zu existieren [Arriagada, 1992]. Zusätzlich findet sich auch nicht-PHF-assoziiertes hyperphosphoryliertes und dysfunktionales Tau im Gehirn von AD-Patienten [Lu, 1993].

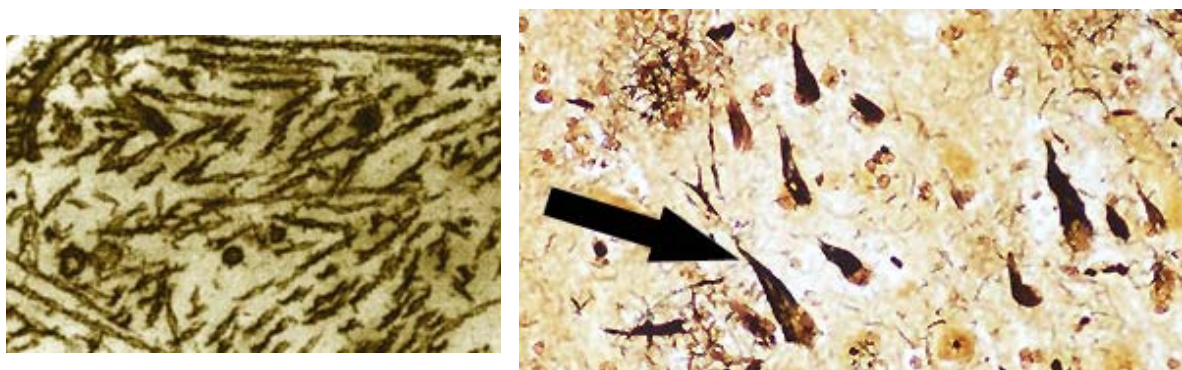


Abb. 1.19: Paired helical filaments (PHFs) und Neurofibrilläre Bündel (NFT) [St. George-Hyslop, 2001; Intq 20]

Das **Tau-Protein** kommt in 6 Isoformen vor, die durch alternatives Spleißen der Exone 2, 3 und 10 einer mRNS generiert werden und kann prinzipiell in vier Regionen aufgeteilt werden: eine Amino-terminale Region, eine Prolin-reiche Region, die Mikrotubuli-Bindungsregion (enthält 3-4 ähnliche, aber nicht identische Sequenzen) und die Carboxy-terminale Region [Brandt, 2004]. Zusätzlich zum alternativen Spleißen der mRNS ist die dynamische Phosphorylierung und Dephosphorylierung spezifischer Stellen der Tau-Proteine ein wichtiger Regulator der physiologischen Tau-Funktion, denn darüber wird die Fähigkeit des Tau, Mikrotubuli zu binden und zu stabilisieren, geregelt [Lindwall, 1984].

Mikrotubuli sind stark zylindrische Polymere aus α - und β -Tubulin und spielen eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Zellprozessen, der Aufrechterhaltung der Zellpolarität und beim intrazellulären Transport z.B. von Signalmolekülen und Zellorganellen wie Mitochondrien und Vesikel entlang des Axons [Drewes, 1998; Ballatore, 2007].

Unter physiologischen Bedingungen werden die verschiedenen Isoformen von Tau an spezifischen Stellen von bestimmten Kinasen phosphoryliert, was in unterschiedlichen Kompartiment-abhängigen Effekten resultiert.

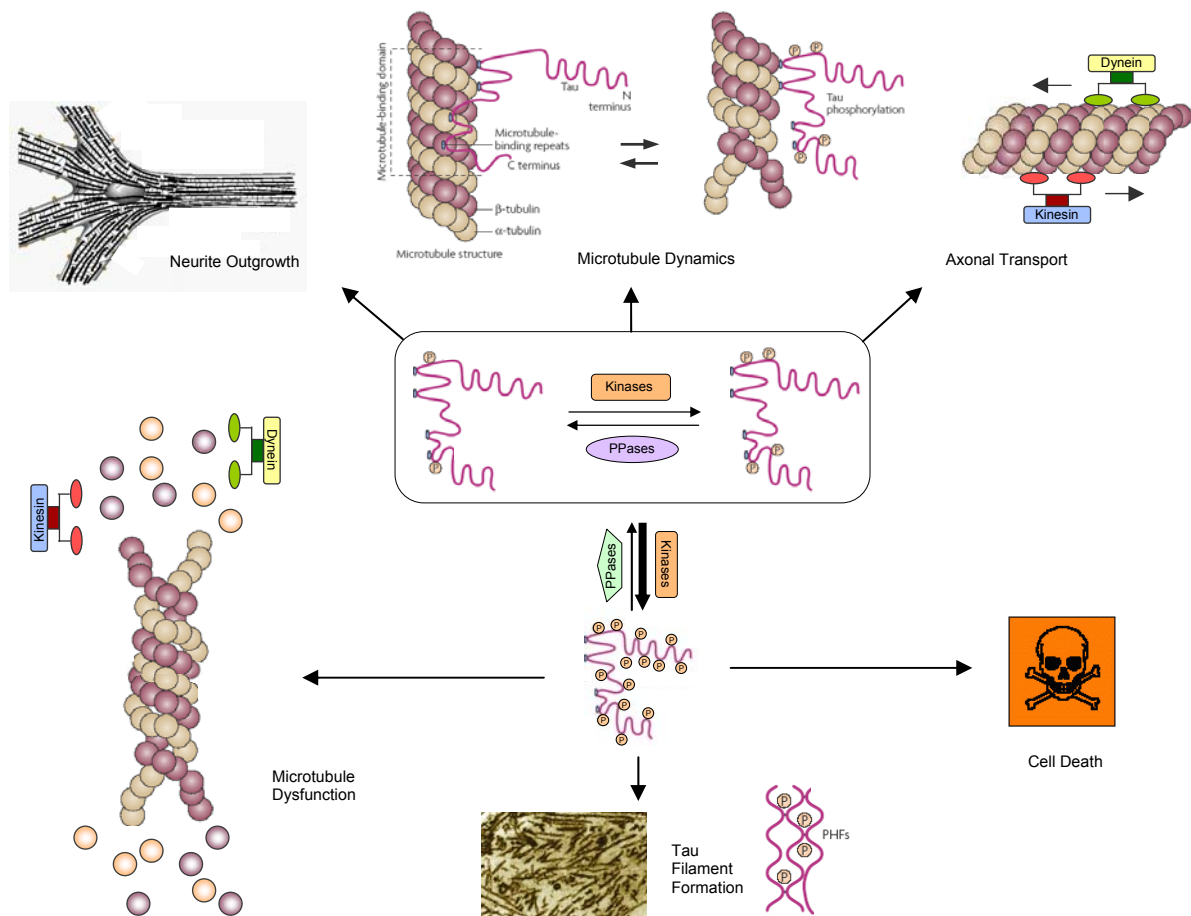


Abb. 1.20: Physiologische Funktionen und pathophysiologische Effekte der Tau-Phosphorylierung (Abb. modifiziert nach [Mi, 2006 und Mazanetz, 2007])

Unter **pathologischen Bedingungen**, wie bei AD, ist das Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung gestört und Tau liegt abnormal hyperphosphoryliert vor. Dies kann schließlich in Tau-Dysfunktion d.h. Ablösung von den Mikrotubuli (was deren Zusammenbruch triggert), Oligomerisierung, PHF-Formation und Akkumulation zu unlöslichen NFTs münden [Mi, 2006] (s. Abb. 1.20). Obwohl Tau normalerweise phosphoryliert ist, könnte daher eine ungünstige, übersteigerte Phosphorylierung an bestimmten Positionen eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Tau-Pathologie bei AD einleiten, da die physiologischen Funktionen (Stabilisierung der Mikrotubuli, Regulation des axonalen Transportes) nicht mehr ausgeführt werden und sogar toxische Effekte auftreten können, die zur Degeneration des Neurons führen [Mandelkow, 1998; Iqbal, 2005]. Ein gestörter axonaler Transport könnte auch aus der Ablagerung fibrillären Materials innerhalb der Nervenzellen resultieren.

Für mehr als 20 verschiedene **Kinasen** wurde eine Phosphorylierung von Tau *in vitro* bestätigt. Welche jedoch *in vivo* wirklich Tau phosphorylieren, ist noch nicht völlig geklärt [Mi, 2006]. Zu den wahrscheinlichsten Kandidaten gehören die Enzyme GSK-3 (glycogen synthase kinase), cdk5 (cyclin dependent kinase), PKA (protein kinase A) und MARK (microtubule affinity regulation kinase) [Imahori, 1997; Mandelkow, 1998; Stoothoff, 2005; Blurton-Jones, 2006; Mazanetz, 2007] (s. Abb. 1.21). Eine Überexpression von GSK-3 führt z.B. zu einem dramatischen Anstieg des Phosphorylierungsstatus an verschiedenen Stellen des Tau-Proteins [Mi, 2006].

Die Aktivität der Kinasen kann durch verschiedene Mechanismen moduliert werden, wovon einige im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

In Zellkulturstudien konnte gezeigt werden, dass z.B. **β -Amyloid**, wahrscheinlich über eine Erhöhung der Aktivität der Kinase, in die Verstärkung der Phosphorylierung durch die **GSK-3** einbezogen ist [Busciglio, 1995; Grimes, 2001; Mi, 2006; Blurton-Jones, 2006].

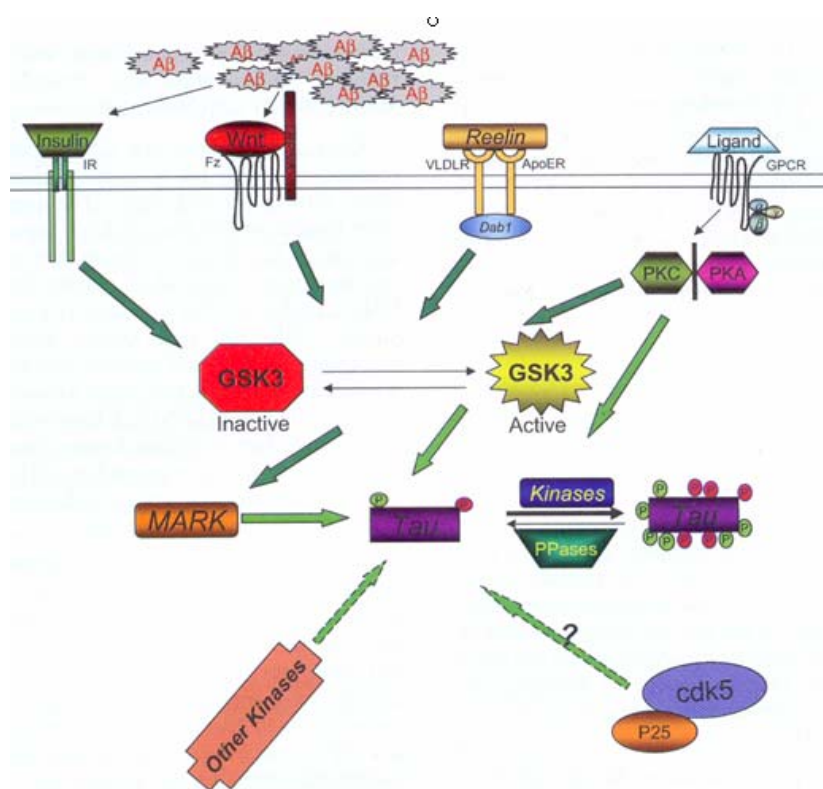


Abb. 1.21: Regulation der Tau-Phosphorylierung [Mi, 2006]

Weiterhin könnte A β die Aktivierung von **cdk5** über eine indirekte Stimulierung des cdk5-Aktivators p25 erreichen [Mi, 2006]. Die A β -induzierte Hyperphosphorylierung von Tau könnte so durch eine Destabilisierung des Mikrotubuli - Netzwerkes den Zelltod triggern [Blurton-Jones, 2006].

Tau spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Regulation des axonalen Transports. Auch dies wird durch spezifische

Phosphorylierungen, z.B. durch die **MARK**, und damit verbundene Affinitätsänderungen beeinflusst [Mandelkow, 2004]. Eine Überexprimierung dieses Enzyms kann gleichermaßen zu Hyperphosphorylierung von Tau und zur Lösung der Bindung zu den Mikrotubuli führen [Drewes, 1997].

Zu einer Aktivierung der GSK-3 könnte weiterhin eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration beitragen (s. Kap. 1.2.3).

Zusammenfassend kann man sagen, dass GSK-3, cdk5 und MARK direkt oder indirekt modulierend auf die Phosphorylierung von Tau einwirken können. Eine Überexpression vieler anderer Kinasen zeigte in Zellmodellen ebenfalls einen Anstieg der hyperphosphorylierten Form von Tau [Mi, 2006].

Eine wachsende Anzahl von Studien legt nahe, dass neben A β auch pro-inflammatorische **Zytokine** die Tau-Pathologie und NFT-Formation verstärken können. *In vitro*-Studien zeigten, dass IL-6 eine Tau-Hyperphosphorylierung über die Erhöhung der cdk5-Aktivität in hippocampalen Neuronen von Ratten steigern kann [Quintanilla, 2004]. Ähnliches wurde auch in kortikalen Neuronen über IL-1 berichtet [Li, 2003 b]. Auch die A β -induzierte NO-Freisetzung kann zu Hyperphosphorylierung führen [Saez, 2004]. Diese *in vitro*-Ergebnisse wurden durch verschiedene Tierstudien unterstützt [Blurton-Jones, 2006].

Insulin vermag *in vitro* unter physiologischen Bedingungen, vermittelt über den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Proteinkinase B-Signalweg, die Aktivität der GSK-3 über eine Phosphorylierung des Enzyms herabzuregulieren (s. Abb. 1.21), was sich in einer Reduktion der Phosphorylierung von Tau und einer Stabilisierung der Mikrotubuli zeigt [Mi, 2006; Deutsch, 2006]. A β besitzt jedoch eine antagonistische Wirkung auf den Insulin-Rezeptor, was in einer Aktivierung der GSK-3 und damit stärkeren Phosphorylierung von Tau resultieren würde [Xie, 2002].

Die Transduktion von **Reelin** (Signalprotein, wichtig für die Vermittlung der synaptischen Plastizität) durch spezifische LDL (low-density-lipoprotein)-Rezeptoren wie VLDLR und apoER2 ist ein wichtiger Regulator einer Kaskade intrazellulärer Phosphorylierungen, die letztlich unter physiologischen Bedingungen in einer Inhibition der Phosphorylierung von Tau und damit Vermeidung einer Hyperphosphorylierung endet [Cooper, 1999; Hiesberger, 1999] (s. auch Abb. 1.21). **ApoE4** (s. Kap. 1.1.7.4) ist in der Lage die Bindung von Reelin an VLDLR und apoER2 im Zellmodell zu vermindern [Deutsch, 2006]. Eine Überexpression von ApoE4 könnte daher über eine Modulierung der Reelin-Signaltransduktionskaskade zu einer Hyperphosphorylierung von Tau beitragen.

Neben der erhöhten Aktivität der Kinasen, scheinen die mRNA- und Protein-Level, sowie die Aktivität von dephosphorylierenden **Phosphatasen** wie PP2A im Gehirn von Alzheimer-Patienten stark erniedrigt zu sein, so dass eine reduzierte Dephosphorylierung von Tau durch PP2A ebenso zur Entwicklung der neurofibrillären Degeneration beitragen kann [Gong, 1995; Vogelsberg-Ragaglia, 2001; Sontag, 2004; Mi, 2006]. So führte in kultivierten Neuronen eine Inhibition bestimmter Phosphatasen zu einer erhöhten Tau-Phosphorylierung [Sontag, 1996] und damit zum Funktionsverlust.

Darüber hinaus wurden verschiedene andere Prozesse wie oxidativer Streß und Inflammation beschrieben, die ebenfalls zu einem abnormalen Ablösen des Tau von den Mikrotubuli führen könnten [Ballatore, 2007].

Tau liegt normalerweise unstrukturiert und gelöst in einer „Random Coil“-Struktur vor. Die Tau-Sequenz enthält allerdings bestimmte Bereiche, die unter anderem durch Hyperphosphorylierung eine Konformationsänderung zu einer β -Faltblattstruktur eingehen können, was wiederum eine Umwandlung des Proteins in PHFs und NFTs mit anschließender Aggregation und dadurch Degradationsresistenz auslösen könnte [Pickardt, 2005; Ballatore, 2007]. Vor kurzem wurde herausgefunden, dass die pathologischen Formen von Tau als direkte Effektoren der Apoptose wirken können (sogenannte „toxic gain of function“) [Fasulo, 2000]. Welche Spezies von Tau letztlich toxisch wirken, ist noch nicht völlig geklärt, vieles spricht jedoch eher für PHF bzw. andere lösliche niedermolekulare hyperphosphorylierte Tau-Aggregate anstelle von NFTs [Mazanetz, 2007].

1.2.3 Ca-Homöostase

Eine Analyse des Hirngewebes von Alzheimer-Patienten lieferte Hinweise, dass Veränderungen in der Calcium-Homöostase mit neurodegenerativen Prozessen bei AD assoziiert sind, die schon vor der Entwicklung detektierbarer Plaques, Tangles und kognitiver Defizite auftreten [LaFerla, 2002; Mattson, 2003; Stutzmann, 2005 und 2006].

Calcium ist z.B. als **second messenger** beteiligt an einer Reihe von Zellfunktionen einschließlich der Gentranskription [Mellstrom, 2001], Erregbarkeit von Membranen [Davies, 1996; Stutzmann, 2003] und synaptischer Plastizität [Nakamura, 1999; Fujii, 2000]. Viele Signale sind gekoppelt mit Rezeptoren, die den $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -Signalweg (s. Abb. 1.22) aktivieren. Dazu gehören z.B. muskarinerge ACh-Rezeptoren und Glutamat-Rezeptoren [Mattson, 2000 a].

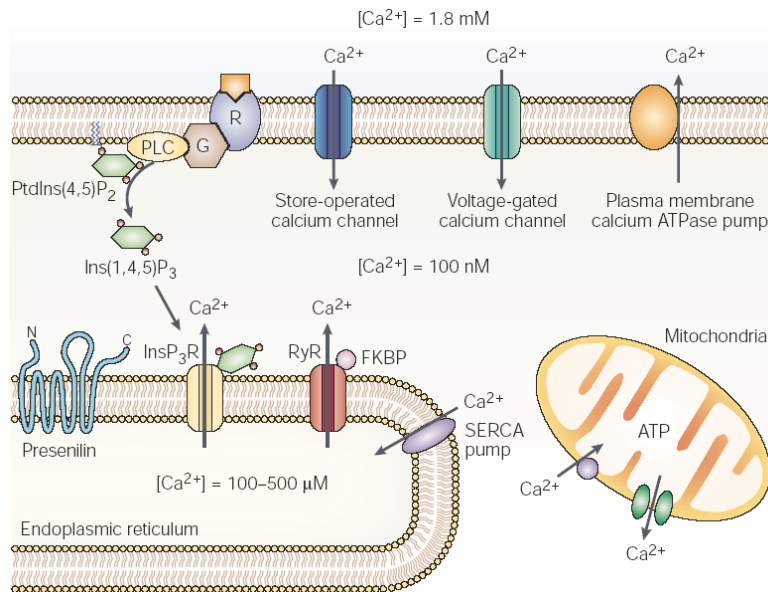


Abb. 1.22: Ionenkanal- und rezeptorgesteuerte Regulation der Calcium-Homöostase (Abb. aus LaFerla, 2002)

Ca-Ionen gelangen ins Zytosol entweder aus extrazellulären Quellen über spannungsabhängige bzw. rezeptorgesteuerte Calciumkanäle in der Zellmembran oder über Freisetzung aus dem ER durch die Aktivierung von Inositoltriphosphat (IP₃)- und/oder Ryanodin (Ry)-Rezeptoren (s. Abb. 1.22). Neben der Aktivierung des InsP₃R durch den

Ins(1,4,5)P₃-Signalweg werden diese Rezeptoren über die Konzentration an Calcium im Zytosol reguliert, welches die Freisetzung von Ca aus den Speichern des ER ab einer bestimmten zytosolischen Ca-Konzentration unterdrückt und damit einer Überladung der Zelle mit toxischen Konzentrationen an Calcium entgegenwirkt [Stutzmann, 2007]. Zwischen dem ER-Lumen und dem Zytoplasma besteht ein Ca-Gradient, der in der anderen Richtung durch eine ATP-abhängige Pumpe (SERCA, smooth ER Ca²⁺ ATPase) aufrechterhalten wird [Mattson, 2000 a]. Die Aufrechterhaltung der Ca-Homöostase erfordert eine Stabilisierung des gewaltigen Ca-Reservoirs im ER.

Ursachen und Folgen einer Störung der Ca-Homöostase:

Abnormale Regulation des ER-Calcium wurde durchweg bei einer Reihe von verschiedenen **Presenilin** (PS)-exprimierenden Modellsystemen einschließlich Fibroblasten von FAD-Patienten und kultivierten Neuronen gefunden [Guo, 1996; Etcheberrigaray, 1998]. Die PS-assoziierten Calciumveränderungen scheinen spezifisch bzgl. der intrazellulären ER-Depots zu sein und beeinflussen nicht den Calcium-Einstrom durch die spannungsabhängigen Ca-Kanäle in der Plasmamembran [Stutzmann, 2003, 2004]. PS sind in großer Menge in den Membranen des ER lokalisiert und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der ER-Calcium-Signalweiterleitung [LaFerla, 2002]. Sie scheinen u.a. mit den Ry-Rezeptoren zu interagieren [Chan, 2000; Mattson, 2003; Stutzmann, 2007] und sind im Rahmen der γ -Sekretase-Aktivität an der Bildung des **AICD**-Fragments (APP intracellular domain) beteiligt, für das – ähnlich dem NICD von NOTCH – eine Funktion als Transkriptionsfaktor im Zellkern angenommen wird

(s. Kap. 1.2.1.2). Leissring *et al.* [2002] zeigten, dass AICD den Phosphoinositid-vermittelten Calcium-Signalweg regulieren kann.

Mutationen in den APP- oder PS-Genen können zudem die Menge an gebildetem A β bzw. das Verhältnis von A β_{42} zu A β_{40} beeinflussen und so zur neuronalen Degeneration beitragen, da die erhöhte Produktion und Aggregation neurotoxischer Formen von A β im Verdacht stehen, eine verstärkte Apoptose und Exzitotoxizität zu verursachen [Guo, 1996, 1997, 1999; Mattson, 1997, 2000 b].

Die Ursache für eine veränderte APP-Verarbeitung bei den sporadischen Formen von AD ist noch nicht klar, aber erhöhte Level von intrazellulärem Calcium könnten eine wichtige Rolle spielen. Als Beweis für diese Hypothese kann die Beobachtung angeführt werden, dass eine Behandlung kultivierter Zellen mit Verbindungen, die einen Calcium-Einstrom in die Zelle auslösen, zu einer vermehrten Bildung von A β führte [Querfurth, 1994].

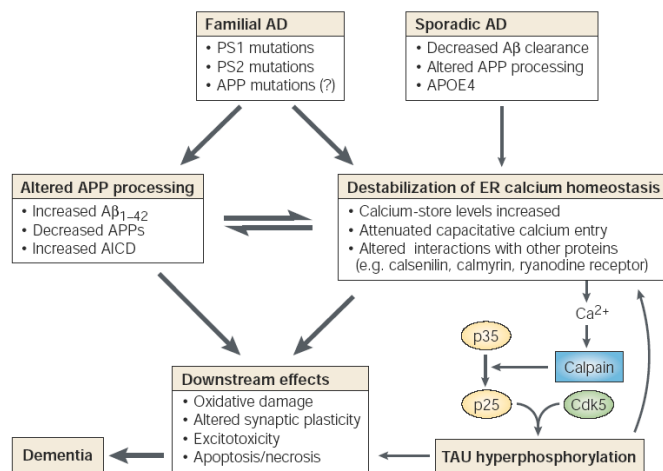


Abb. 1.23: Calcium-Homöostase und Neuropathologie von AD (Abb. aus [LaFerla, 2002])

Eine Beziehung zwischen A β und Calcium wurde schon in den frühen 90er Jahren hergestellt, als gezeigt werden konnte, dass A β -Peptide wie A β_{40} und A β_{42} die intrazelluläre Ca-Konzentration durch Bildung kationenselektiver (einschließlich Ca²⁺), calciumpermeabler und spannungsunabhängiger Kanäle erhöhen können [Kawahara, 2000, 2001, 2004]. Dies wurde zuerst an Lipid-Bilayer-Präparaten [Arispe, 1993 a,b] und später in verschiedenen Zelllinien einschließlich humaner Fibroblasten und hypothalamischer Neuronen beobachtet [Kawahara, 2000; Zhu, 2000]. Diese **Kanalbildung** könnte z.B. zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration und dadurch zu einem verstärkten metabolischen Streß für das Neuron beitragen [Zhu, 2000]. Zusätzlich ist A β in der Lage bereits existierende spannungsabhängige Calciumkanäle und den NMDA-Rezeptor in der Zellmembran zu beeinflussen [Stutzmann, 2007].

Unter Berücksichtigung, dass A β auch schon in der Kindheit in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) nachgewiesen wird [Fukuyama, 2000], muss es genetische oder umweltbedingte Faktoren geben, die zur Kanalbildung und damit zur Neurotoxizität von A β beitragen. Solche Faktoren könnten **Membranlipide** darstellen, da die Lipidzusammensetzung (z.B. aufgrund von positiven oder negativen Ladungen) stark die Einlagerung von Peptiden in die Membran beeinflusst [Kawahara, 2004]. Nach der Einlagerung von A β in Membranen könnte es z.B. zur Strukturänderung, zur Aggregation und/oder Kanalbildung kommen. Die Membranfluidität wird zudem kontrolliert über Cholesterol, welches die Festigkeit der Membran erhöht und damit ebenfalls eine Kanalbildung sowie die Aktivitäten membrangebundener Enzyme (wie z.B. Sekretasen) beeinflusst [Lundbaek, 1996, Arispe, 2002] (s. Kap. 1.2.1.3 a).

Da Apolipoprotein E4 (ein Risikofaktor bei AD) in den Cholesteroltransport und -metabolismus involviert ist, hat es Einfluss auf die Zusammensetzung von Membranen, damit auf die Rate der Kanalbildung durch A β und könnte so durch Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration zur Pathogenese von AD beitragen [Kawahara, 2004; Stutzmann, 2007].

Aufgrund der veränderten APP-Verarbeitung **verminderte Level von sAPP α** könnten ebenfalls zu einer Störung der Ca-Homöostase und damit zur neuronalen Degeneration bei AD beitragen, da für sAPP α eine wichtige Rolle bei der Regulation der synaptischen Plastizität und des Zellüberlebens angenommen wird [Mattson, 2003]. Über eine Aktivierung cGMP-vermittelter Signalwege, die zu einer Aktivierung von Kalium-Kanälen und Membranhyperpolarisation führen, kann sAPP die zelluläre Calcium-Homöostase stabilisieren und ist dabei entscheidend in der Fähigkeit, Neuronen gegen exzitatorische Schäden und A β -Toxizität zu schützen [Mattson, 1993 a,b; Furukawa, 1996]. Ebenso wurden neuroprotektive Effekte von sAPP [Mattson, 1993 a,b] sowie eine Funktion in Lern- und Gedächtnisprozessen *in vivo* dokumentiert [Gschwind, 1996].

Eine **Überaktivierung des NMDA-Rezeptors** durch Glutamat (s. Kap. 3.3), besonders unter metabolischem und oxidativem Stress, kann über den Ins(1,4,5)P $_3$ -Signalweg (s. Abb. 1.22) zu einer übersteigerten Freisetzung von Calcium aus den intrazellulären Depots des ER beitragen [Mody, 1995] und somit die intrazelluläre Ca-Konzentration erhöhen, was wiederum zu einer Aktivierung metabolischer Reaktionen in Mitochondrien und damit zur vermehrten Freisetzung von **reaktiven Sauerstoffspezies** (ROS) wie Superoxid-Anion O $_2^{\cdot-}$ führen kann. Aus der Bindung von Calcium an Calmodulin (CaM) und Aktivierung der iNOS kann eine erhöhte Freisetzung von NO resultieren, welches in der Lage ist mit O $_2^{\cdot-}$ Peroxynitrit ONOO $^-$ zu bilden (s. Kap. 1.2.4).

Reaktive Sauerstoffspezies können z. B. durch Lipidperoxidation (LP) zu Schäden in der Zellmembran und damit zur Beeinflussung membranständiger ATPasen (Na^+/K^+ - und Ca^{2+} -ATPasen), Transportproteine, Glucose- und Glutamat-Rezeptoren führen, was den unregulierten Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle verstärken kann [LaFerla, 2002] (s. Abb. 1.24) und zu Membrandepolarisation und Erhöhung der basalen intrazellulären Ca^{2+} -Level führt [Mattson, 2003].

Memantin, ein nicht-kompetitiver NMDA-Rezeptor-Antagonist, zeigte günstige Effekte in der Behandlung von Patienten mit schwerer Demenz [Winblad, 1999], was auf einer Unterdrückung des übersteigerten Calcium-Einstroms und damit der teilweisen Wiederherstellung der normalen Ca^{2+} -Homöostase in Nervenzellen beruhen könnte [Mattson, 2003].

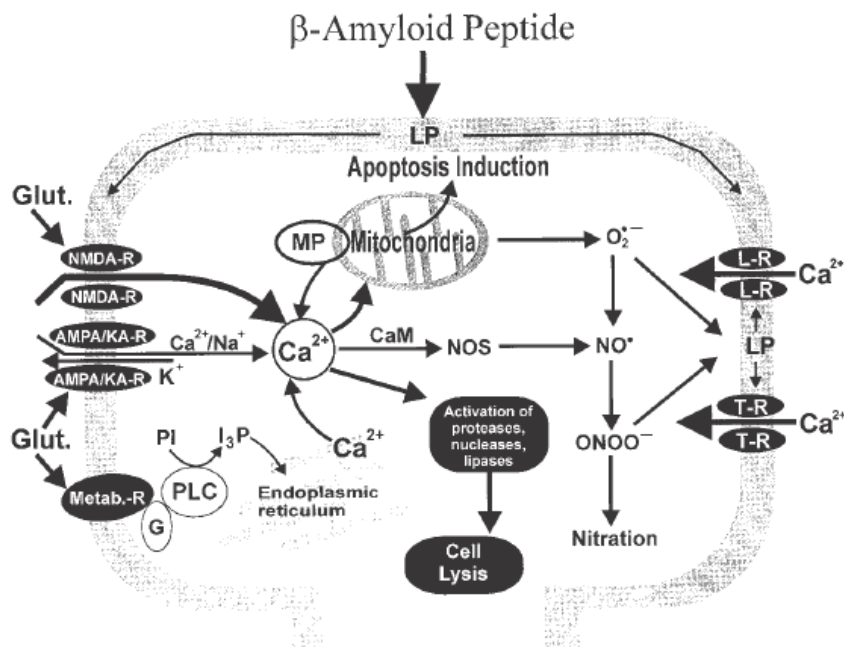


Abb. 1.24:

Schematische Darstellung des Einflusses von A β auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase, ROS-Produktion und apoptotische Prozesse (Abb. aus [Bachurin, 2003])

Eine große Zahl von **Enzymen** (u.a. Proteasen, Phosphatasen, Kinasen und Phospholipasen) könnten durch Störung der Calcium-Homöostase in ihrer Funktion negativ beeinflusst werden, was z.B. Veränderungen des Zytoskeletts, Veränderung der synaptischen Plastizität, Zellsignalfunktionen und Einleitung apoptotischer Vorgänge mit sich bringen könnte [Mattson, 1991, 1994; Deshpande, 2006; Glabe, 2006] und über viele Jahre hinweg zu einer Reduktion der Anzahl der aktiven Synapsen und neuronaler Prozesse führen würde.

Es gibt eindeutige Beweise, dass eine Ca^{2+} -Dysfunktion die **A β_{42} -Bildung** und **Tau-Hyperphosphorylierung** verstärken kann [Querfurth, 1994; LaFerla, 2002; Pierrot, 2004, 2006]. Erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentrationen können z.B. Calcium-aktivierte Kinasen wie GSK-3 β (s. Kap. 1.2.2), MAPK (mitogen-activated protein kinase) und PKC (protein kinase C) aktivieren, welche eine Phosphorylierung von Tau vermitteln [Avila,

2004]. Folglich können erhöhte Calcium-Level, egal aus welcher Quelle, durch Hochregulierung der Kinaseaktivität zu einer initialen Entwicklung von neurofibrillären Bündeln führen [Stutzmann, 2007]. Ein Teufelskreis ergibt sich dadurch, dass extrazelluläres, hyperphosphoryliertes Tau (aus bereits degenerierten Neuronen) wiederum in der Lage ist, z.B. in Neuroblastomazellen, eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration über eine Interaktion mit muskarinergen Acetylcholinrezeptoren zu triggern [Gomez-Ramos, 2006].

Konzentrationen von freiem und Protein-gebundenem Calcium waren im Vergleich zu Tangle-freien Neuronen erhöht in Zellen, die neurofibrilläre Tangles enthielten [Mattson, 2003]. Nixon *et al.* [1994] zeigten ebenfalls erhöhte Level von Ca-abhängigen Proteasen in Tangle-haltigen Neuronen. Derartig erhöhte Ca-Konzentration könnten einer Tangle-Bildung vorausgehen.

Zusammenfassend können die unregulierte, andauernde Freisetzung von Ca aus den intrazellulären Depots oder Einstrom aus dem Extrazellulärraum schließlich zu einer erhöhten Aktivierung Ca-abhängiger Signalwege, Aktivierung von Vorgängen aufgrund von metabolischen Stress im ER, Störungen des mitochondrialen Metabolismus und Aktivierung apoptotischer Prozesse führen [Berridge, 1998]. Die biochemischen Kaskaden, die zu einer **Zellapoptose** führen, werden auch bei Mattson *et al.* [2000 a, 2003] und Stutzmann [2007] diskutiert.

1.2.4 Inflammation und oxidativer Stress

Neben den senilen Plaques und neurofibrillären Bündeln ist die Alzheimer'sche Krankheit ebenfalls durch massive entzündliche Vorgänge gekennzeichnet [Akiyama, 2000]. Dies wurde durch die verstärkte Anwesenheit aktivierter Mikroglia, reaktiver Astrozyten, Komplementfaktoren, Arachidonsäurederivate und Entzündungsmediatoren wie z.B. Interleukin IL-1, IL-6 und TNF α in der Nähe der A β - und Tau-Ablagerungen im Gehirn von Alzheimer-Patienten bekräftigt [Akiyama, 2000; Ferencik, 2001; Zilka, 2006].

Es wurde daher vermutet, dass die, z.B. von A β -induzierte, chronische Entzündung zur Neurodegeneration bei der AD beiträgt [Czirr, 2006]. Andererseits kann auch die Entzündung die weitere Produktion und Ablagerung von A β fördern [Akiyama, 2000]. Mögliche positive Effekte entzündlicher Vorgänge in Richtung Beseitigung des vorhandenen Amyloid sind allerdings auch denkbar [Eriksen, 2003].

Unlösliche Aggregate von A β und/oder Tau könnten eine Hauptrolle in der Initiierung inflammatorischer Prozesse im Gehirn von Alzheimer-Patienten spielen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass **A β** über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in der Lage ist, Astrozyten und Mikroglia zu aktivieren, was mit einer verstärkten Freisetzung von IL-1, IL-6, TNF α , Komplementfaktoren, Akute-Phase-Proteine, reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS, RNS) einschließlich Stickstoffmonoxid (NO) verbunden war [Sugaya, 2000; Combs, 2001 a,b; Blurton-Jones, 2006; Sastre, 2006 a,b; Zhou, 2007]. Die Freisetzung von **Zytokinen** und Chemokinen kann dann wiederum zur Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten mit weiterer Sekretion pro-inflammatorischer Mediatoren führen und so einen Teufelskreis einleiten [Ho, 2005]. A β -Toxizität und APP-Verarbeitung auf dem amyloidogenen Weg werden aber ebenfalls durch IL-1 (und TNF α) verstärkt [Mackenzie, 2000; Zhou, 2007], so dass eine erhöhte IL-1-Freisetzung durch Mikroglia wiederum in einem zweiten Teufelskreis verstärkend auf die Expression von APP und A β -Peptid einwirken kann [Sugaya, 2000; Lucas, 2006; Zilka, 2006].

Über verschiedene Wege, wie z.B. die Stimulation der induzierbaren NO-Synthase (**iNOS**) und damit der NO-Freisetzung [Bamberger, 2001; Lucas, 2006], kann IL-1 zudem die neuronale Apoptose triggern [Hu, 1997], was dann erneut Mikroglia aktiviert [Zilka, 2006].

A β ist, ebenso wie Tau-Proteine, in der Lage das **Komplementsystem** aktivieren, welches nachfolgend die Aggregation von A β verstärken kann und so einen Teufelskreis aus aggregierendem A β und dadurch aktiviertem Komplementsystem einleiten [Ferencik, 2001].

Mikroglia sind ebenfalls eine Quelle anderer inflammatorischer Moleküle wie Prostaglandine, die neben den Zytokinen eine zentrale Stellung in der Regulation des Entzündungsgeschehens spielen [Sugaya, 1998]. **Prostaglandine** (PGs) sind wichtige inflammatorische Mediatoren, die im Rahmen der Arachidonsäure-Kaskade neben anderen beteiligten Enzymen durch die Aktivität der Cyclooxygenase gebildet werden [Ho, 2006] und z.B. regulatorische Funktionen bei der Immunantwort und bei inflammatorischen Prozessen haben. Die Cyclooxygenase, COX, PGHS oder auch Prostaglandin-Endoperoxid-Synthase genannt, kommt in verschiedenen Isoformen vor: COX-1, COX-2 und wahrscheinlich COX-3, einer Splice-Variante der COX-1 mit noch unbekannter Funktion [Townsend, 2005].

Die konstitutive Form der COX, die **COX-1**, wird von vielen verschiedenen Zelltypen gebildet und hat klare physiologische Funktionen wie z.B. die Produktion von zytoprotektivem Prostaglandin E_2 (PGE_2) im Gastrointestinaltrakt [Vane, 1998] (s. Kap. 1.4), die Aufrechterhaltung der vaskulären Homöostase, des renalen Blutflusses, sowie die Regulation der Plättchenaktivierung und –aggregation [Fiorucci, 2001].

COX-2 ist ebenso ein konstitutives Enzym, allerdings kann seine Expression durch inflammatorische Stimuli (IL-1, $TNF\alpha$, ROS, RNS) etwa um den Faktor 20 erhöht werden – daher wird es eher als induzierbares Enzym angesehen [Mitchell, 1999]. Da die COX-2 in der Lage ist pro-inflammatorische Zytokine zu regulieren, spielt sie eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen [Sugaya, 2000].

Primäre Zellkultur-Experimente zeigten, dass pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 und $TNF\alpha$ zu einer Hochregulierung der COX-2- und PGE_2 -Expression in Neuronen, Astrozyten und Mikroglia führen können. Andererseits kann eine erhöhte COX-2-Expression die Produktion von Zytokinen, Prostanoiden und Mediatoren von oxidativem Stress verstärken, woraus eine erhöhte Neurodegeneration in verschiedenen Gewebekultur-Modellen resultiert [Akiyama, 2000; Weggen, 2007].

Pasinetti *et al.* [1998] berichten, dass mRNS- und Protein-Level der COX-2 (und in geringerem Maße ebenso der COX-1) in betroffenen Hirnregionen hochreguliert sind. An der erhöhten COX-2-Gen-Expression ist wahrscheinlich eine Aktivierung des Transkriptionsfaktor NF- κ B beteiligt [Sugaya, 2000].

Aktiviert Mikroglia sind weiterhin an der Bildung **reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies** beteiligt [Heneka, 2001 a]. Wenn die Menge an freien Radikalspezies die Inaktivierungskapazitäten des Neurons übersteigt, tritt oxidativer Stress auf, gefolgt von mitochondrialer Dysfunktion, Schädigung von Lipiden, DNS und Proteinen bis hin zum neuronalen Zelltod.

Eine Aktivierung von Mikroglia wird z.B. auch durch A β hervorgerufen. *In vitro* bewirkte fibrilläres A β eine verstärkte Produktion neurotoxischer reaktiver Sauerstoffspezies über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase in Monozyten, Mikroglia und Makrophagen [Bianca, 1999; Ferencik, 2001]. A β führte in hippocampalen Neuronen zu einer verstärkten Wasserstoffperoxid-Akkumulation und damit, über eine Generierung von Hydroxylradikalen, zur Lipidperoxidation in Zellmembranen [Aslan, 2004].

Superoxid-Anion $O_2^{\cdot -}$ ist das primäre freie Radikal, das verstärkt durch Reduktion von molekularem Sauerstoff im Rahmen einer gestörten Zellatmung in den Mitochondrien entstehen kann [Aslan, 2004] und in Gegenwart von Stickstoffmonoxid (**NO**) in der Lage

ist, reaktive Stickstoffspezies wie Peroxynitrit (ONOO^-) zu bilden. Peroxynitrit kann wiederum aufgrund seiner hohen Reaktivität mit einer Reihe von Biomolekülen (Proteine, Lipide, DNS) reagieren und diese durch oxidative Prozesse schädigen [Droge, 2002] (s. Kap. 1.2.3).

Glia-Zellen und Astrozyten können **NO** insbesondere durch die Aktivität der iNOS über eine NADPH-abhängige oxidative Desaminierung von Arginin synthetisieren. Die Expression dieses Enzyms wird durch Entzündungsmediatoren wie IL-1 und $\text{TNF}\alpha$, aber auch von β -Amyloid stimuliert [Weldon, 1998; Heneka, 1998, 2001 a; Ishii, 2000; Combs, 2001 b; Lucas, 2006] und ist im Gehirn von Alzheimer-Patienten stark erhöht [Heneka, 2001 a]. Eine Schädigung und Absterben der umgebenden Neuronen durch lokale Freisetzung zytotoxischer Konzentrationen von NO sind daher möglich [Chao, 1996; Heneka, 1998, 2001 a]. Ishii *et al.* [2000] konnten zeigen, dass A β -Peptide über eine Aktivierung der iNOS direkt die NO-Produktion von Gliazellen im AD-Gehirn stimulieren konnten, ein Effekt, der durch selektive Inhibitoren der iNOS rückgängig gemacht werden konnte. *In vitro* und *in vivo* wurde diese Inhibition z.B. auch durch NSAIDs wie Indometacin und Ibuprofen erreicht [Ogawa, 2000; Lleó, 2007].

Als möglichen Mechanismus zeigten Ignarro *et al.* [1996] auf, dass NSAIDs durch Inhibition von **NF- κ B** eine Verminderung der iNOS mRNA-Level erreichen können. Dies könnte z. B. indirekt über eine Aktivierung von PPAR γ erfolgen (s. Kap. 1.2.1.3 b).

Die Bindung bestimmter **NSAIDs** an **PPAR γ** führt zu einer Hemmung der mikroglialen Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ aber auch der Expression der iNOS [Combs, 2000; Ogawa, 2000] und der COX-2, letzteres wahrscheinlich ebenfalls über eine Hemmung von NF- κ B [Landreth, 2001].

Für **Indometacin** ist z.B. beschrieben, dass es die erhöhte Sekretion von APP durch IL-1 (s.v.) blockieren kann, was zusätzlich auf einen Zusammenhang zwischen Prostaglandinen und der IL-1-vermittelten APP-Prozessierung hindeutet [Dash, 1995]. Auf diese Weise könnten Eicosanoide wie die PGs eine Amyloid-Ablagerung und Neurodegeneration in AD z.B. über eine veränderte APP-Verarbeitung verstärken. Die für Indometacin beschriebenen neuroprotektiven Effekte könnten daher z.T. sowohl auf einer Inhibition von IL-1 als auch einer Verminderung der NO-Freisetzung beruhen [Du, 1999].

Neben der pro-inflammatorischen Freisetzung von Entzündungsmediatoren wird für die Mikroglia allerdings auch eine positive Rolle in AD vermutet, da sie in der Lage sind, die Menge an senilen Plaques durch **Phagozytose und Abbau der A β -Peptide** zu reduzieren [Jantzen, 2002; D'Andrea, 2004; Zilka, 2006]. Sowohl in Astrozyten als auch in

Mikroglia wurden A β -Fragmente gefunden. Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob diese das Resultat einer Phagozytose-Aktivität sind, oder eine Konsequenz aus der eigenen Verarbeitung von APP zu A β . Sie könnten daher günstige Effekte auf die Beseitigung von Amyloid-Plaques ausüben. Eine chronische Aktivierung scheint dagegen eine weitere Zerstörung und neuropathologische Veränderungen im Gehirn bei AD nach sich zu ziehen. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass inflammatorische Zytokine die mikrogliale Phagozytose vermindern können, so dass die Unterdrückung des endogenen Abbaumechanismus von A β zur Akkumulation von Amyloid-Plaques im Gehirn von AD-Patienten beitragen könnte [Lleó, 2007]. Jantzen *et al.* [2002] äußern zudem die Vermutung, dass im Frühstadium der AD, wenn die A β -Ablagerungen noch nicht chemisch z.B. durch Razemisierung, Isomerisierung oder Kürzungen modifiziert sind, eine Aktivierung von Mikroglia mit anschließendem Abbau der A β -Depots günstig und möglich ist, während später bei fortschreitender Pathologie der AD diese modifizierten Depots nicht mehr so einfach von Mikroglia phagozytiert werden können, so dass daraus schließlich extreme Aktivierungszustände der Mikroglia resultieren könnten - näher beschrieben bei Jantzen *et al.* [2002] und McGeer *et al.* [2001].

Die Beobachtung, dass inflammatorische Vorgänge zur Neurodegeneration bei AD beitragen können, hat zu der Überlegung geführt, dass eine anti-inflammatorische Therapie ein Fortschreiten der AD verlangsamen könnte [Du, 1999] (s. Kap. 1.3.2.1).

1.3 Therapie der Alzheimer'schen Erkrankung

Die Therapie demenzieller Erkrankungen wie der AD ist sehr komplex und besteht sowohl aus medikamentösen als auch aus psychosozialen Behandlungsstrategien.

Psychosoziale Strategien umfassen z.B. Trainingsmaßnahmen zur Verbesserung kognitiver Funktionen wie Gedächtnis und Lernen, sowie verhaltenstherapeutische Ansätze. Grundsätzlich können dabei Trainingserfolge erzielt werden, jedoch sind die Effekte meist nur kurzzeitig und häufig werden nur gerade trainierte Verhaltensweisen beeinflusst [Höfler, 2004].

Die medikamentöse Therapie unterteilt sich grob in zwei Bereiche: die Therapie kognitiver Störungen mit Antidementiva und die Therapie nicht-kognitiver Störungen wie z.B. Depression, psychotische Syndrome, Angstzustände und Aggressivität, die häufig eine Demenz begleiten. Die Behandlung von nicht-kognitiven Störungen bei Demenz-Syndromen erfolgt im Wesentlichen mit zwei Arzneimittelgruppen: mit Neuroleptika wie Risperidon [Katz, 1999; Brodaty, 2003] und mit Antidepressiva wie z.B. dem

Monoaminoxidase-Hemmer Moclobemid [Roth, 1996]. Mit Ausnahme der beiden genannten Wirkstoffe liegen für viele andere Verbindungen häufig nur unzureichende klinische Studien bei AD vor.

Psychosoziale Behandlungsstrategien sowie die Therapie nicht-kognitiver Störungen sind jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht Gegenstand der näheren Betrachtungen, vielmehr soll in den nächsten Kapiteln auf die medikamentöse Therapie kognitiver Beeinträchtigungen eingegangen werden.

1.3.1 Derzeitige Pharmakotherapie

Für die Behandlung einer leichten bis mittelschweren AD stehen derzeit verschiedene Medikamente zur Verfügung, deren Wirksamkeit anhand klinischer Studien gezeigt werden konnte. Hierzu gehören die Acetylcholinesterase-Hemmer (AChE-Hemmer) und der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin. Bei leichten kognitiven Störungen finden weiterhin Ginkgo-biloba-Präparate und andere Antioxidantien und „Nootropika“ sowie Calciumkanalblocker (z.B. Nimodipin) Anwendung, allerdings sind bei diesen Verbindungen positive Effekte auf die Alzheimer'sche Krankheit im Rahmen klinischer Studien noch nicht eindeutig bewiesen.

Antidementiva können zwar den Untergang der Nervenzellen nicht verhindern, sie können aber die Folgeerscheinungen des Nervenzelluntergangs und damit die Symptomatik der AD vorübergehend reduzieren. So kann die Lebensqualität der Betroffenen zumindest für eine begrenzte Zeit erhalten werden. Eine Heilung der Krankheit ist aufgrund der hauptsächlich noch unverstandenen Ursachen und Wechselwirkungen der einzelnen Faktoren zur Zeit noch nicht möglich.

In Abb. 1.25 sind einige mögliche Angriffspunkte bei der Alzheimertherapie zusammengefaßt. Wie man erkennen kann, greifen die Acetylcholinesterase-Hemmer am Ende dieser Kaskade an. Da diese Substanzen neben Memantin (s. Kap. 1.3.1.2) die zur Zeit am wirksamsten und am meisten verabreichten Medikamente in der Therapie darstellen, ist leicht ersichtlich, dass die Alzheimer-Demenz derzeit nur symptomatisch behandelt wird.

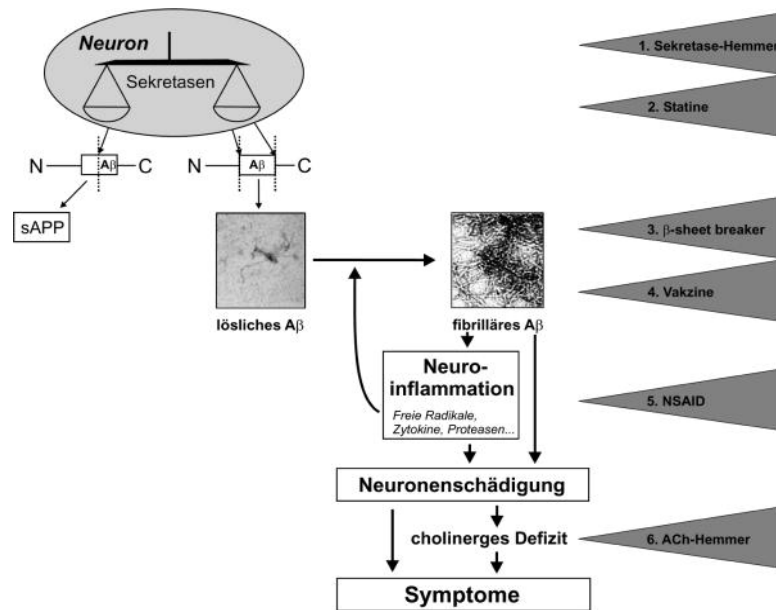


Abb. 1.25: Mögliche Angriffspunkte von Pharmaka bei AD (Abb. aus [Intq 21])

1.3.1.1 Acetylcholinesterase-Hemmer (AChE-Hemmer)

Historisch betrachtet sind die AChE-Hemmer die erste und am besten erforschte Gruppe von Substanzen für die Therapie des Morbus Alzheimer und gehören heutzutage zur Standardtherapie. Von der Food and Drug Administration (FDA) in den USA sind bisher vier verschiedene Verbindungen für die Behandlung der leichten bis mittelschweren AD zugelassen: Tacrin, Donepezil, Rivastigmin und Galantamin, wobei Tacrin mittlerweile aufgrund seiner Nebenwirkungen (wie Hepatotoxizität bei ~50 % aller Patienten [Lleó, 2006]) nur noch selten verordnet wird. Die Grundlage ihres Einsatzes bildet die sogenannte „**Acetylcholinmangel-Hypothese**“: infolge der fortschreitenden neuronalen Degeneration im Verlauf der AD sinkt die Zahl der cholinergen Neuronen und die damit einhergehende cholinerge synaptische Transmission im Neocortex und Hippocampus [Lleó, 2006]. Diese verminderte Erregungsübertragung könnte eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der kognitiven, funktionalen und verhaltensbedingten Symptome von AD spielen.

Acetylcholin (ACh) wird in cholinergen Neuronen durch die Aktivität der Cholinacetyltransferase gebildet, in Vesikeln konzentriert und nach einer Depolarisation in den synaptischen Spalt abgegeben, von wo es an der prä- und postsynaptischen Membran mit muscarinergen und nicotinergen Acetylcholin-Rezeptoren wechselwirken und weitere Signaltransduktionswege auslösen kann (s. Abb. 1.26). Im synaptischen Spalt wird ACh durch die AChE und in geringerem Maße durch die Butyrylcholinesterase (BuChE) abgebaut.

Durch den großen Verlust an Neuronen in Alzheimer-Gehirnen ist die Konzentration von ACh abnormal niedrig, so dass die Verbesserung der kognitiven Funktionen

möglicherweise durch eine Erhöhung der für die synaptische Transmission verfügbaren Menge an ACh erreicht werden kann [Rogers, 1998 a,b.].

Wie gezeigt werden konnte, ist eine erhöhte Konzentration an ACh, resultierend aus einer Hemmung der AChE, verbunden mit einer Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten [Darvesh, 2003].

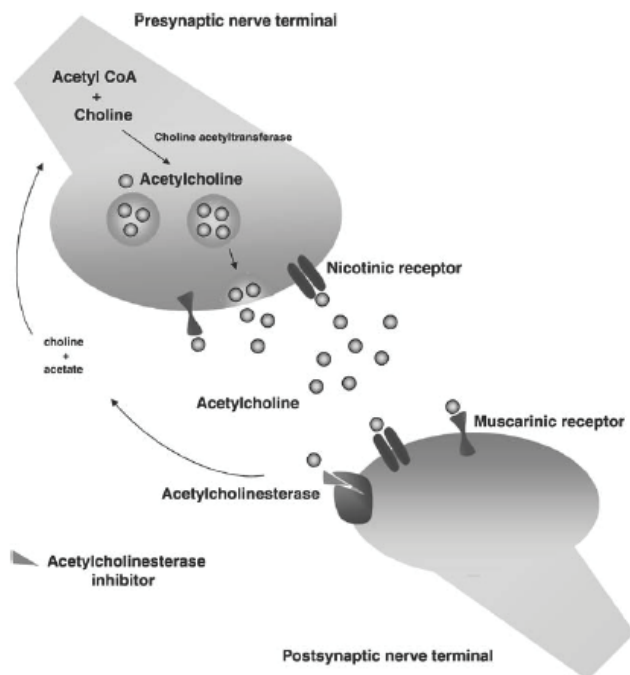


Abb. 1.26: Acetylcholin-Biosynthese, synaptische Transmission, deren Inhibition sowie Metabolismus von ACh [Lleó, 2006]

kortikale Konzentrationen von AChE bei AD erniedrigt, von BuChE aber signifikant erhöht sind [Perry, 1978; Geula, 1995; Darvesh, 2003] und es scheint, dass in Abwesenheit von AChE die BuChE einige Funktionen der AChE kompensieren kann [Li, 2000 b; Mesulam, 2002]. Zudem wurden hohe Konzentrationen an BuChE assoziiert mit Plaques und Tangles gefunden [Geula, 1995; Darvesh, 2003].

Zunehmend gerät auch eine Inhibition der **BuChE** in den Fokus der Forschung, da

Inestrosa *et al.* [1996, 2005] konnten zeigen, dass **AChE** ebenfalls mit Amyloid-Plaques bei AD co-lokalisiert ist und die Aggregation von A β zu Fibrillen beschleunigen kann, wobei hier die periphere anionische Bindungsstelle der AChE (PAS) eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Eine Inhibition am aktiven Zentrum, welches für die Hydrolyse von ACh verantwortlich ist, hatte keine Auswirkungen auf die Amyloid-Aggregation, eine selektive Hemmung der PAS hingegen blockierte den Effekt der AChE auf die Aggregatbildung.

Aus einer Hemmung der AChE und BuChE könnten daher günstige Effekte auf AD resultieren.

Die drei hauptsächlich in der Therapie der leichten bis mittelschweren AD verwendeten **AChE-Inhibitoren** Donepezil, Rivastigmin und Galantamin zeigten in klinischen Studien geringe aber signifikante Verbesserungen der kognitiven Funktionen und Aktivitäten des täglichen Lebens bei vergleichsweise geringem Nebenwirkungsprofil [Rogers, 1998 a,b; Lilienfeld, 2002; Onor, 2007]. Rivastigmin inhibiert sowohl AChE als auch die BuChE, welche neben ACh auch andere Cholinester vor allem in der Peripherie metabolisiert, Donepezil und Galantamin sind dagegen selektive AChE-Hemmer ohne bzw. mit nur geringer Affinität zu BuChE [Onor, 2007].

In einer 24-wöchigen Studie bei leichter bis mittelschwerer AD mit entweder 5 mg/d bzw. 10 mg/d **Donepezil** gegen Placebo konnte z.B. eine deutliche Verbesserung der kognitiven Funktionen (u.a. mittels ADAS-cog. und MMSE bestimmt) und des Gesamteindrucks der Verumgruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe festgestellt werden, wobei die Effekte dosisabhängig anstiegen (s. Abb. 1.27) [Rogers, 1998 b.]. Nach der 24-wöchigen Testphase wurde eine 6-wöchige Auswaschphase angeschlossen, nach der jedoch keine signifikanten Unterschiede der Verum-Gruppen in der ADAS-cog. und dem MMST zur Placebo-Gruppe mehr festgestellt werden konnten. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die positiven Effekte von Donepezil an die dauerhafte Einnahme gebunden sind [Rogers, 1998 b.]. Auch kann durch eine Therapie mit Donepezil der Verlauf der Krankheit nur verlangsamt, nicht aber aufgehalten werden, was ebenfalls anhand der Grafik deutlich wird.

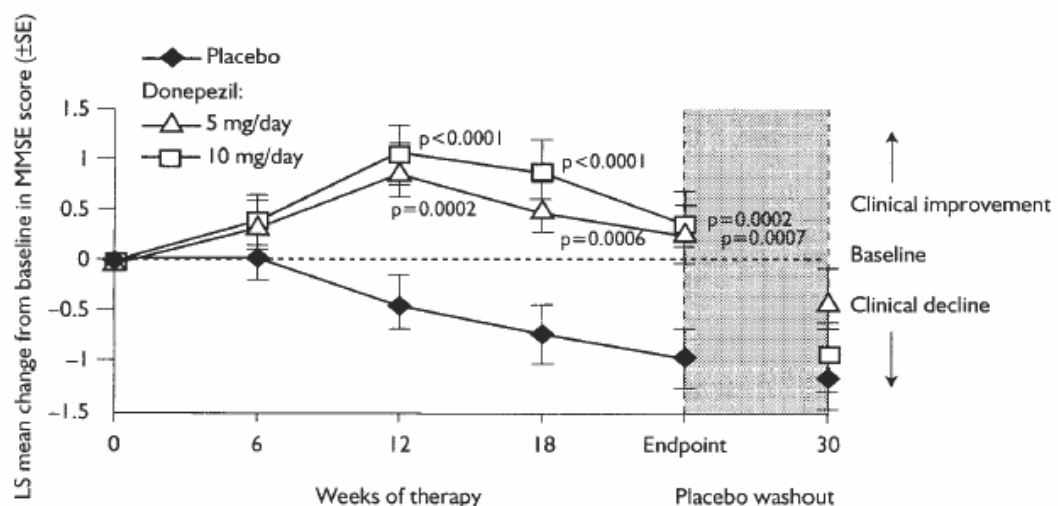


Abb. 1.27: MMSE im Verlauf der Behandlung mit Placebo oder Donepezil nach Rogers [1998 b]

Zusätzlich zu den synthetischen AChE-Inhibitoren wird **Huperzin A** als potentiell Alzheimer-Therapeutikum untersucht [Little, 2008], ein Alkaloid aus *Huperzia serrata*, einer in der traditionellen chinesischen Medizin bekannten Heilpflanze (chin. Name: Qian Ceng Ta).

1.3.1.2 NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin

Neben dem cholinergen System sind bei der AD aber auch andere Neurotransmittersysteme wie z.B. das glutamaterge System beeinträchtigt. Bei Glutamat handelt es sich um einen wichtigen exzitatorischen Neurotransmitter, der bei Funktionen wie Lernen, Gedächtnis, Motorik und Wahrnehmung beteiligt ist.

Memantin ist ein nicht-kompetitiver Antagonist des NMDA (N-Methyl-D-Aspartat) - Rezeptors, der seit 2002 in Europa zur Behandlung der fortgeschrittenen, d.h. mittelschweren bis schweren Demenz zugelassen ist und dessen positive Effekte bei guter Verträglichkeit durch Studien belegt sind [Reisberg, 2003; Lleó, 2006].

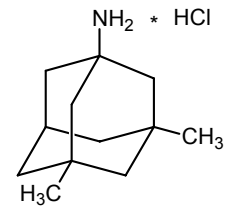


Abb. 1.28: Memantin

Bei degenerativen Hirnerkrankungen wie AD wird die Überstimulierung von NMDA-Rezeptoren und dadurch bedingte Überladung von Nervenzellen mit Calcium als wesentlicher pathologischer Faktor angesehen (s. Kap. 1.2.3).

Durch eine gestörte Freisetzung und Aufnahme von Glutamat befindet sich auch im "Ruhezustand" immer eine geringe Menge Glutamat im synaptischen Spalt, so dass die Blockade des NMDA-Rezeptors durch Magnesium aufgehoben wird und es zu einem dauerhaften leichten Einstrom von Calcium-Ionen in die postsynaptische Nervenfasern kommt. Die Folge ist eine krankhafte Erhöhung der Calcium-Konzentration in der Nervenzelle. Normale Signale gehen im dadurch erhöhten „Grundrauschen“ unter (s. Abb. 1.30); es findet keine Signalwahrnehmung statt. In der Nervenzelle selbst kommt es durch die dauerhaft erhöhte Konzentration von Calcium-Ionen zu verschiedenen Veränderungen wie z.B. der Induktion einer Vielzahl von Enzymen, der vermehrten Bildung freier Radikale und Schädigungen der DNS. Diese Prozesse führen auf Dauer zu einem Funktionsverlust und schließlich zum Absterben der Nervenzelle. Genau wie Magnesium bei gesunden Menschen hat Memantin die Fähigkeit, den NMDA-Rezeptorkanal zu blockieren, dies aber auch bei der permanenten Anwesenheit von Glutamat im synaptischen Spalt. Es schützt somit die postsynaptische Nervenzelle vor dem andauernden krankhaften Einstrom von Calcium-Ionen. Wird nun die Nervenzelle aktiviert, z.B. während eines Lern- oder Gedächtnisvorgangs, so erhöht sich kurzfristig die Glutamat-Freisetzung, was, genau wie beim Gesunden, zu einer Freigabe des NMDA-Rezeptors und zum Einstrom von Calcium-Ionen in die postsynaptische Zelle führt. Da das Grundrauschen durch Memantin gesenkt wurde, ist das Lernsignal wieder überschwellig, kann also wieder erkannt und weitergeleitet werden. Die normale glutamaterge Neurotransmission wird

dabei nur wenig beeinflusst, weil Memantin nicht direkt an der eigentlichen Glutamat-Bindungsstelle, sondern nicht-kompetitiv an der Bindungsstelle für Magnesium angreift (s. Abb. 1.29).

Abb. 1.29: Bindungsdomänen am NMDA-Rezeptor [nach Mutschler, 2001]

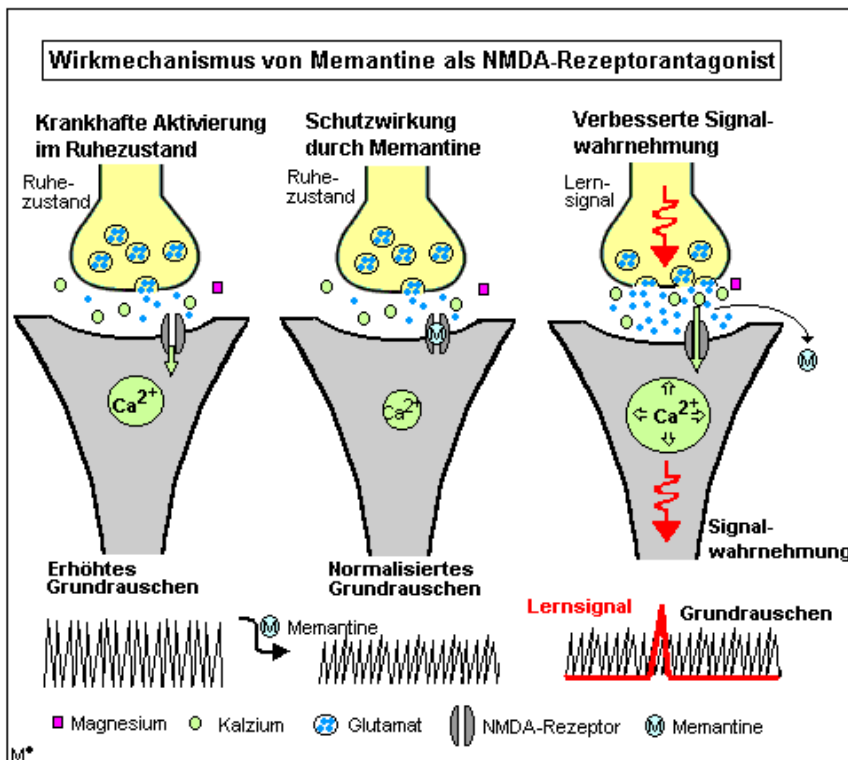
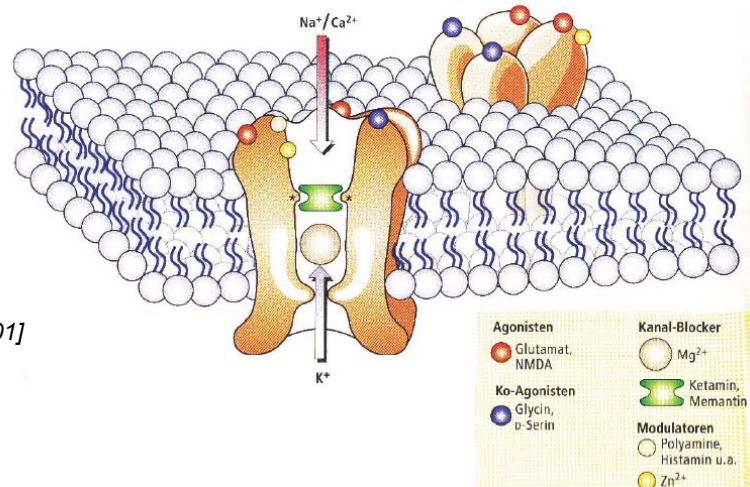


Abb. 1.30: Wirkungsmechanismus von Memantin [Intq 22]

1.3.1.3 Nootropika

Bei den mit dem nicht eindeutig definierten Begriff Nootropika bezeichneten Substanzen handelt es sich im weitesten Sinne um Arzneimittel, Nahrungsergänzungsmittel oder andere Substanzen, denen durch Beeinflussung des Zellmetabolismus im Gehirn und Verhinderung von Zellschäden durch endo- oder exogene Noxen eine vorteilhafte Wirkung auf das zentrale Nervensystem zugesprochen wird und die Gedächtnis-, Konzentrations- und Auffassungsvermögen, Denken und Orientierung verbessern sollen.

Ein einheitlicher pharmakologischer Wirkungsmechanismus ist nicht vorhanden und die Wirksamkeit bei Hirnleistungsstörungen umstritten.

Zu den Nootropika zählen zum Beispiel Piracetam sowie Ginkgo-biloba-Präparate.



Für den Ginkgo-biloba-Extrakt EGb 761 liegen Studien und Berichte vor, die eine Verbesserung der Gedächtnisleistung bestätigen [Le Bars, 1997; Ramassamy, 2007], in anderen Studien konnte dagegen kein klinisch relevanter Effekt für Ginkgo-Extrakte festgestellt werden [van Dongen, 2000, 2003; Solomon, 2002]. Eine Meta-Analyse von Oken *et al.* [1998] spricht EGb 761 ebenfalls eine geringe Verbesserung der kognitiven Funktionen zu. Die Wirksamkeit der Extrakte soll z.B. auf antioxidativen, anti-inflammatorischen sowie neuroprotektiven Effekten beruhen [Oken, 1998; Ancelin, 2007]. Aufgrund der uneinheitlichen Datenlage im Bezug auf die Wirksamkeit in der Behandlung altersbedingter Gedächtnisstörungen wie bei der AD wurden Extrakte des Ginkgo-Baumes z.B. von der Cochrane Collaboration und der American Academy of Neurology als nicht hinreichend bestätigt eingestuft [Höffler, 2004].

Auch bei Piracetam liegen keine gesicherten Studienergebnisse vor, die eine signifikante Verbesserung kognitiver Parameter belegen [Miloni, 2007], jedoch werden für die Substanz mehrere neuroprotektive Wirkungsmechanismen wie z.B. Beeinflussung des Energiestoffwechsels, der zentralen Neurotransmission oder der Membranfluidität angenommen [Höffler, 2004].

1.3.1.4 Antioxidantien

In post-mortem-Studien von Patienten mit AD wurden verschiedene Marker für oxidative Schäden einschließlich Lipidperoxidation, erhöhte Protein- und DNS-Oxidation sowie eine verminderte Anzahl an mehrfach ungesättigten Fettsäuren festgestellt [Markesbery, 1999]. Die Resultate einiger Studien lassen vermuten, dass Antioxidantien wie z.B. Vitamin C und E, die auch als Nootropika (s. Kap. 1.3.1.3) eingesetzten Extrakte von Ginkgo biloba, Östrogene (s. Kap. 1.3.2.3) sowie Liponsäure derartige Zellschäden vermindern können und damit das Risiko an AD zu erkranken senken.

Wie schon bei den Ginkgo-Extrakten zeigen die klinischen Studien für Vitamin C und E insgesamt betrachtet jedoch widersprüchliche Ergebnisse [Sano, 1997; Boothby, 2005; Lleó, 2006; Ancelin, 2007; Kontush, 2008] von einer signifikanten Verlangsamung des Eintritts bzw. Fortschreitens der Alzheimer-Symptomatik bis hin zu keinerlei Effekten. Die

vorhandenen Daten liefern somit keinen eindeutigen Beweis, dass diese Vitamine die AD günstig beeinflussen.

1.3.1.5 Calciumantagonisten

Calciumantagonisten wie Nimodipin sollen durch eine Stabilisierung der Calciumhomöostase einen anti-exzitatorischen Effekt ausüben und damit neuroprotektiv wirken. Die Datenlage zur Wirksamkeit von Nimodipin bei der Behandlung von AD wird aber für eine Anwendung als Antidementivum als nicht ausreichend angesehen [Morch, 1996; Quizilbash, 1999; Lopez-Arrieta, 2002; Eckert, 2005].

1.3.2 Weitere Therapieansätze

Neben den derzeit in der Alzheimer-Therapie etablierten Verbindungsklassen lassen sich, basierend auf der Amyloid-Kaskade, weitere therapeutische Strategien ableiten, die verschiedene Schritte in der Produktion und Ablagerung von A β zum Target haben. Einige werden bereits in präklinischen oder klinischen Studien erforscht [Golde, 2001 a,b]. Diese Strategien zielen auf die Produktion, die Aggregation oder die Beseitigung von A β im ZNS und beinhalten z.B. die Entwicklung von Hemmern der A β -produzierenden Proteasen (β - und γ -Sekretase), A β -basierende Immunotherapien, Inhibitoren der A β -Aggregation und Substanzen, die diese Aggregate zerstören können [Golde, 2002]. Große Aufmerksamkeit wurde weiterhin Substanzen zuteil, welche aufgrund epidemiologischer Studien Alzheimer-protektive Wirkungen zeigten und ein vertretbares Nebenwirkungsprofil aufwiesen. Diese Strategien schließen z.B. eine Langzeitbehandlung mit nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAIDs), Östrogenersatztherapie oder die Behandlung mit HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statinen) ein.

1.3.2.1 Nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs)

a.) Protektive Effekte

Der erste Hinweis über eine mögliche **präventive Wirkung von NSAIDs** bei AD resultierte aus der epidemiologischen Beobachtung, dass bei Personen mit Arthritis ein vermindertes Vorkommen von AD festzustellen war [McGeer, 1990]. Seither haben mehrere retrospektive Studien diese Beobachtung bestätigt [Breitner, 1995; Stewart, 1997; Zandi, 2002; In't Veld, 2001; Lleó, 2007].

Eine Meta-Analyse von 9 Studien aus dem Jahre 2003 machte deutlich, dass die Einnahme von NSAIDs mit einer verringerten Alzheimer-Inzidenz verbunden war, wobei dieser positive Effekt mit zunehmender **Einnahmedauer** der Substanzen größer wurde [Etminan, 2003]. Andere Studien bestätigten die Schlußfolgerung, dass der volle Nutzen erst nach etwa 2 Jahren der Anwendung erreicht werden könnte [Stewart, 1997; Etminan, 2003]. In der „Rotterdam-Studie“ [In’t Veld, 2001] wurde in der Verumgruppe ebenfalls eine signifikante Reduzierung der AD-Inzidenz um bis zu 80 % festgestellt, welche um so größer war, je länger die Substanzen eingenommen worden waren. Zandi *et al.* [2001] konnten dementsprechend keine Beziehung zwischen dem AD-Risiko und einer *zeitgleichen* Einnahme von NSAIDs beobachten, vielmehr fanden sie eine signifikante Reduktion der Inzidenz, wenn die Substanzen regelmäßig in den Jahren vor der Diagnose von AD eingenommen wurden. Beides könnte erklären, warum in einigen kurzzeitigen Studien keine Risikominderung festgestellt wurde [Fourrier, 1996; Henderson, 1997].

Stewart *et al.* [1997] und Etminan *et al.* [2003] konnten weiterhin zeigen, dass ASS nur einen geringen, aber nicht signifikanten, positiven Effekt auf die Entwicklung von AD ausübte, wobei auch bei längerer Einnahmedauer keine Änderung erkennbar war. Auch in der Rotterdam-Studie wurde der Einfluß von Salicylaten untersucht, auch hier war der Effekt im Vergleich zu **NSAIDs** wie Diclofenac, Ibuprofen oder Naproxen wesentlich geringer [In’t Veld, 2001]. (Letztere machten in dieser Studie etwa 80 % der NSAID-Verschreibungen aus.) Aus diesen Ergebnissen läßt sich schlußfolgern, dass nicht alle entzündungshemmenden Substanzen gleichzeitig und in gleichem Maße das Alzheimer-Risiko senken können.

Weggen *et al.* [2001] erkannten, dass bestimmte NSAIDs unabhängig von ihrer COX-Aktivität in der Lage sind, die **Bildung von A β ₄₂** zu vermindern - bei gleichzeitiger Bevorzugung der kürzeren Varianten wie z.B. A β ₃₈ (s. Kap. 1.2.1.3). Vlad *et al.* [2008] untersuchten daher den Einfluß von unterschiedlichen NSAIDs mit oder ohne A β ₄₂-senkende Wirkung auf das Risiko an Alzheimer zu erkranken. Sie fanden heraus, dass sich eine Langzeiteinnahme von NSAIDs prinzipiell protektiv gegen Alzheimer auswirkte, jedoch waren die Effekte unterschiedlich ausgeprägt – einige NSAIDs zeigten eindeutige protektive Effekte, einige gar keine und bei einigen war das Ergebnis unklar. Ibuprofen und Indometacin konnten unter den getesteten Verbindungen als die am stärksten protektiv wirkenden identifiziert werden, welche zudem eine A β ₄₂-senkende Wirkung besitzen. Von den nicht A β ₄₂-senkenden NSAIDs waren einige wie die COX-2-Inhibitoren Celecoxib und Rofecoxib sowie ASS ohne Einfluß auf das Alzheimer-Risiko. Bei vielen NSAIDs war der Effekt jedoch aufgrund der geringen Patientenzahlen und der hohen Abbruchrate infolge unerwünschter Nebenwirkungen nicht eindeutig zu bestimmen.

Insgesamt zeigte sich daher kein signifikanter Unterschied in den beiden Gruppen mit $A\beta_{42}$ -senkender bzw. nicht-senkender Wirkung [Vlad, 2008]. Neben der $A\beta_{42}$ -senkenden Wirkung könnten auch andere Mechanismen eine wichtige Rolle spielen.

b.) Effekte bei AD

Die protektiven Effekte von NSAIDs scheinen sich besonders präventiv bzw. in Frühstadien der AD günstig auszuwirken [Lleó, 2007], lassen sich jedoch kaum mehr nachweisen, wenn die Alzheimer'sche Krankheit bereits diagnostiziert wurde [Lleó, 2006; Vlad, 2008]. Mit Ausnahme einer kleinen Studie mit Indometacin an nur 28 **Alzheimer-Patienten**, die eine signifikante Verlangsamung des Fortschreitens der Symptomatik im Vergleich mit der Placebogruppe beschrieb [Rogers, 1993], berichten klinische Studien an Patienten mit AD meist nur von geringen bzw. keinen positiven Effekten der NSAID-Anwendung. So deutete z.B. eine Studie mit Diclofenac und Misoprostol [Scharf, 1999] einen positiven Effekt in der Verumgruppe an, allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede in standardisierten Testverfahren wie dem ADAS-cog. festgestellt werden [Zandi, 2001]. In einer größeren Studie mit dem COX-2-Hemmer Rofecoxib und Naproxen konnte keine Verminderung des Fortschreitens der kognitiven Ausfallerscheinungen im Vergleich zur Placebogruppe erkannt werden [Aisen, 2003]. Die Ursache der negativen Resultate dieser Studien könnte in einer unzureichenden Dauer bzw. einem ungünstigen Zeitpunkt des Beginns der Behandlung liegen, da ein Benefit von NSAIDs bei AD bevorzugt in Frühphasen bzw. präventiv festgestellt wurde [Lleó, 2007] (s.v.). Weiterhin wurden in Studien häufig COX-2-selektive NSAIDs eingesetzt, welche z.B. keine $A\beta_{42}$ -senkende Wirkung vorweisen [Lleó, 2007]. Es ist daher wahrscheinlich, dass die Wirkung bestimmter NSAIDs auch auf COX-unabhängigen Mechanismen basiert, die nur von einigen Substanzen dieser Klasse geteilt werden [Weggen, 2007]. Dies wird bestätigt durch NSAIDs mit $A\beta_{42}$ -senkender Wirkung, aber ohne COX-Inhibition wie R-Flurbiprofen (FlurizanTM), welches in Phase II-Studien vielversprechende Resultate in Patienten mit leichter AD zeigte und sich gerade in den USA und Europa in einer großen Phase III-Studie befindet [Wilcock, 2006; Lleó, 2007].

Welche Dosis von welchem NSAID für wie lange und mit welchem Nutzen/Nebenwirkungsrisiko-Verhältnis für welchen Personenkreis gewählt werden sollte, ist noch unklar [Etminan, 2003]. Jedwede günstigen Effekte von NSAIDs bei AD müssen gegen das Risiko von Nebenwirkungen aufgewogen werden, welche gerade bei Verabreichung hoher Dosen über einen längeren Zeitraum verstärkt auftreten können. Konventionelle NSAIDs können renale und gastrointestinale Nebenwirkungen

verursachen, die, wie z.B. „stille“ Blutungen, sogar zum Tode führen können [Zandi, 2001] (s. Kap. 1.4). Bis Studien die Bedeutung von NSAIDs bei AD nicht eindeutig aufklären, sind sie daher nicht unbedingt für die Behandlung von Alzheimer-Patienten empfohlen.

Auf mögliche Wirkungsmechanismen von NSAIDs im Rahmen der Pathogenese der Alzheimer'schen Krankheit wurde in Kap. 1.2 näher eingegangen.

1.3.2.2 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase-Inhibitoren (Statine)

Statine (Lipidsenker) wirken über die Hemmung des Enzyms 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA)-Reduktase, welche im Rahmen der endogenen Cholesterol-Biosynthese die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonsäure katalysiert. Aus der Hemmung dieses Enzyms resultiert eine verminderte Plasmakonzentration an Gesamt-Cholesterol, Low-density-Cholesterol und Triglyceriden, was bei der Behandlung der Atherosklerose und Dyslipidämien ausgenutzt wird. Veränderte Membran-Cholesterol-Konzentrationen könnten bei AD z.B. über „lipid rafts“ Einfluß auf die Aktivität bestimmter Enzyme wie die γ -Sekretase besitzen (s. Kap. 1.2.1.3 c). Aus der verminderten Mevalonat-Bildung folgt weiterhin eine verminderte Synthese wichtiger Intermediate wie der Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) (s. Abb. 1.31), welche an der posttranslationalen Prenylierung verschiedener Proteine beteiligt sind und eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie Signaltransduktion, Differenzierung und Wachstum beeinflussen [Alegret, 2006]. Aufgrund dieser pleiotropen Effekte ist es möglich, dass sich der Einsatz von Statinen günstig auf die Prävention bzw. Entwicklung von AD auswirken kann.

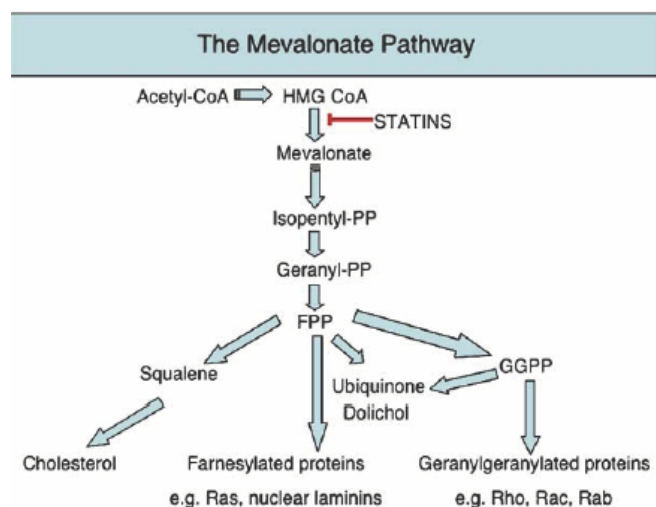


Abb. 1.31: Statine inhibieren die HMG-CoA-Reduktase im Mevalonat-Weg. Endprodukte dieses Weges sind z.B. Cholesterol, FPP und GGPP [Cole, 2006]

Verschiedene epidemiologische Studien legen nahe, dass die Einnahme von Lipidsenkern das Alzheimer- bzw. Demenz-Risiko senken kann [Jick, 2000; Wolozin, 2000]. Neben einer möglichen präventiven Wirkung auf AD fanden andere Studien auch eine Tendenz zur Verbesserung der Symptomatik. In vorläufigen Betrachtungen veröffentlichten z.B. Sparks *et al.* [2005] eine Studie, bei der Verbesserungen der

kognitiven Funktionen (bestimmt mit ADAS-cog. u.a.) und des Verhaltens durch Behandlung mit Atorvastatin festgestellt werden konnten, allerdings war die Anzahl der untersuchten Personen zu gering um ausreichende Aussagen über die Effektivität in AD treffen zu können. Ebenfalls positive Ergebnisse bei AD veröffentlichten Simons *et al.* [2002]. Li *et al.* [2004] fanden dagegen keine signifikante Assoziation zwischen Statin-Behandlung und einem verminderten (oder erhöhten) Risiko von Demenz oder einer möglichen AD, wobei sie die Ursache der Diskrepanzen zwischen den verschiedenen Studien u.a. in Unterschieden im Studiendesign, der Studiendauer und der Verwendung analytischer Methoden vermuten. Oft wird auch nicht zwischen Demenz, AD und möglichen anderen Erkrankungen der Patienten unterschieden. Da es noch kontroverse Diskussionen über eine Prävention bzw. Verzögerung der Krankheit bei bereits bestehender Symptomatik gibt, sind weitere Studien nötig, allerdings besteht die Hoffnung für eine klinische Verwendung von Statinen bei AD [Miida, 2005].

1.3.2.3 Hormone

Östrogene wirken über verschiedene Mechanismen im ZNS, die sowohl modulierende Effekte auf die Synthese, Freisetzung und den Metabolismus von Neurotransmittern, Neuropeptiden und Neurosteroiden als auch neuroprotektive Effekte, die Reduktion der β -Amyloid-Bildung, sowie Auswirkungen auf oxidativen Streß und Inflammation umfassen [Henderson, 2004, 2006; Genazzani, 2007]. Auch eine Erhöhung des zerebralen Blutflusses sowie eine Verbesserung des Glucosetransportes ins Gehirn wurden beschrieben [Henderson, 2006]. Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass eine postmenopausale Östrogen-Ersatztherapie das Risiko vermindern bzw. den Ausbruch von AD verzögern kann. Klinische Studien zeigen dagegen kontroverse Ergebnisse, die eher auf einen Mangel an Effektivität bei Frauen älter als 65 Jahre hindeuten [Genazzani, 2007]. In der „Women’s Health Initiative Memory Study“, einer großen experimentellen Studie zur Bestimmung der Konsequenzen einer Hormonersatztherapie einmal mit Östrogen in Kombination mit Progestin und einmal mit Östrogen allein, wurde sogar eine doppelt so hohe Rate an AD für die Verum-Gruppe festgestellt [Shumaker, 2004]. Die Studie zeigte zudem ein verstärktes Auftreten von Nebenwirkungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall. In anderen Studien wurde weder ein positiver noch ein negativer Effekt erkannt [Henderson, 2006].

Die Diskrepanzen zwischen den Studienresultaten könnten aus unterschiedlicher Methodik, Applikationsart, Einstiegsalter der Probanden u.a. resultieren. Henderson

[2004] und Shumaker *et al.* [2004] schlußfolgern daraus, dass eine Hormonersatztherapie für die Prävention von AD bei Frauen älter als 65 Jahre nicht indiziert ist.

1.3.2.4 Immuntherapie

Bei der Immuntherapie soll durch eine aktive oder passive Immunisierung gegen β -Amyloid eine Verlangsamung des Fortschreitens der Alzheimer'schen Krankheit erreicht bzw. das Auftreten neuritischer Plaques verhindert werden, was im Tiermodell bereits beobachtet werden konnte [Schenk, 1999]. Dabei wurden sowohl Verbesserungen im Lernverhalten der Tiere als auch in der Gedächtnisleistung erzielt [Janus, 2000; Yonkin, 2001].

Erste klinische Studien mußten jedoch wegen schwerer und z.T. tödlicher Nebenwirkungen abgebrochen werden [Schenk, 2002]. Bei der Untersuchung der Gehirne verstorbener Studienteilnehmer zeigte sich, dass durch die Immunisierung eine Entzündung des Gehirns und der Hirnhäute ausgelöst worden war, ebenso allerdings eine deutliche Reduktion der Plaques in bestimmten Hirnregionen erreicht werden konnte. Wenn es gelänge die Nebenwirkungen zu vermeiden, dann könnte die Immunisierung gegen β -Amyloid unter Umständen in die Therapie der AD aufgenommen werden. Neue Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper Bapineuzumab an Patienten mit beginnender AD sind derzeit in den USA in einer klinischen Studie im Gange [Intq 23].

1.3.2.5 Sekretasehemmer

Die Amyloidpathologie, Hauptmerkmal der Alzheimer'schen Krankheit, bietet mehrere mögliche Angriffspunkte.

A β geht durch die sequenzielle proteolytische Spaltung eines Precursor-Proteins (APP) durch β - und γ -Sekretase hervor (s. Kap. 1.2.1). Entwicklungen richten sich daher besonders auf Inhibitoren der β - und γ -Sekretase, wobei letztere neben APP auch für die Spaltung zahlreicher anderer Proteine verantwortlich ist und eventuelle zytotoxische Effekte durch Beeinflussung anderer Stoffwechselwege nicht ausgeschlossen werden können. Ein Ansatz wären u.U. bestimmte NSAIDs, von denen gezeigt werden konnte, dass sie scheinbar selektiv die Aktivität der γ -Sekretase modulieren können ohne die Verarbeitung anderer Substrate zu beeinflussen [Weggen, 2001] (s. Kap. 1.2.1.3 und 1.3.2.1). Vielversprechend erscheint weiterhin eine Hemmung der β -Sekretase, da z.B. BACE 1 – knockout - Mäuse bei ansonsten unauffälligem Phänotyp verringerte Plaquebildung im Gehirn aufwiesen [Luo, 2001].

1.3.2.6 β -Faltblattzerstörer und „plaque buster“

Die Alzheimer-Demenz gehört unter molekularen Gesichtspunkten zu den konformationellen Erkrankungen bei denen eine Fehlfaltung bestimmter Proteine zur Bildung von Produkten führt, die physiologisch nicht mehr verwertbar bzw. schädlich sind [Karkos, 2004]. Nach der Entstehung kann sich die Sekundärstruktur des A β von einer α -Helix zu einem β -Faltblatt wandeln, was eine pathologische Aggregation der A β -Monomere zu Oligomeren und schließlich zu langen Amyloidfibrillen begünstigt, wenn es der Zelle nicht gelingt diese Produkte abzubauen und auszuscheiden.

Gegenwärtig werden niedermolekulare Moleküle hinsichtlich ihrer Fähigkeit, die Aggregation von A β zu hemmen bzw. eine Auflösung bereits bestehender Fibrillen zu triggern, untersucht. Solche Substanzen werden auch als „beta-sheet-breaker“ bzw. „plaque buster“ bezeichnet. Es ist allerdings noch unklar, ob es medikamentös möglich ist, *in vivo* Protein-Protein-Interaktionen zu modulieren [Fassbender, 2003].

1.4 NO und NO-NSAIDs

Nicht-steroidale anti-inflammatorische Verbindungen (NSAIDs) werden hauptsächlich in der Behandlung von Schmerzen, Fieber und Entzündungsprozessen eingesetzt. Für diese Indikationen ist die Hemmung des Enzyms Cyclooxygenase entscheidend, welches den initialen Schritt in der Umwandlung der Arachidonsäure zu Prostaglandinen katalysiert [Vane, 1971, 1998]. **Prostaglandine** (PGs) haben eine wichtige regulatorische Funktion z.B. bei der Immunantwort, aber auch bei inflammatorischen Prozessen. Es wurde gefunden, dass die für die gastrointestinale und renale Regulation wichtigen Prostaglandine normalerweise von der konstitutiven Form der COX, der **COX-1** gebildet werden, während die für Entzündungsvorgänge verantwortlichen Prostaglandine über die Aktivität der induzierbaren Isoform, der **COX-2**, entstehen [Vane, 1994] (s. Kap. 1.2.4).

Die **zytoprotektive Wirkung von PGs** im Rahmen der Prävention von gastrointestinalen Läsionen und Ulcerationen wird hauptsächlich durch endogen gebildetes Prostacyclin und Prostaglandin PGE₂ erreicht, welche die Sekretion der Magensäure durch die Belegzellen des Magens reduzieren, eine direkte vasodilatorische Wirkung auf die Gefäße der Magenschleimhaut ausüben und damit eine Erhöhung der Blutversorgung der Schleimhaut erreichen [Vane, 1998]. Zusätzlich stimulieren Prostanoiden die Sekretion von viskosem Schleim und neutralisierendem Hydrogencarbonat, welche die Magenschleimhaut vor einem Angriff durch die Magensäure schützen [Vane, 1998]. Die Schleimsekretion bildet eine physikalische Barriere gegen Bakterien und toxische Stoffe sowie einen pH-Gradienten mit dem freigesetzten Hydrogencarbonat. Eine ausreichende

Blutversorgung des Gastrointestinal (GI)-Traktes muss aufgrund seiner hohen metabolischen Aktivität und des schnellen Abtransports von resorbierten Toxinen gewährleistet sein. Die Mehrheit der protektiven Prostaglandine entsteht aus der Aktivität der COX-1.

Die dauerhafte Inhibition der COX-1 durch eine Langzeiteinnahme nicht-selektiver NSAIDs und deren topisch reizende Wirkung (aufgrund der Säurefunktion) kann infolgedessen eine Schädigung der gastrointestinalen Schleimhaut bis hin zu Blutungen und lebensbedrohlichen Perforationen sowie eine Funktionsstörung der Nieren und Thrombozyten hervorrufen [Kulkarni, 2000; Ziakas, 2005]. Da NSAIDs aber neben den oben genannten Indikationen auch zunehmend in den Fokus der Alzheimerforschung (s. Kap. 1.2 und 1.3.2.1) geraten, wäre in diesem Zusammenhang eine Langzeittherapie dringend erforderlich.

Wie bereits beschrieben, konnte in verschiedenen Studien zu AD festgestellt werden, dass sich ein positiver Effekt der NSAID-Behandlung auf das AD-Risiko erst nach einer längeren Einnahmezeit von etwa 2 Jahren bemerkbar macht (s. Kap. 1.3.2.1). Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Langzeitanwendung wäre demzufolge ein günstigeres Nebenwirkungsprofil.

In den letzten Jahren wurden daher zwei vielversprechende **Strategien** zur Entwicklung von NSAIDs mit reduzierten gastrointestinalen Nebenwirkungen verfolgt:

- 1.) **Entwicklung selektiver COX-2-Hemmer:** diese sollen die Prostaglandin-Synthese selektiv am Ort des Entzündungsgeschehens hemmen und die konstitutive COX-1 im Gastrointestinal-Trakt aussparen [Kulkarni, 2001; Ziakas, 2005].
- 2.) **Entwicklung von NO-NSAIDs** über die Kopplung des jeweiligen NSAIDs mit einer oder mehreren NO-freisetzenden Gruppen: die durch lokale NO-Freisetzung im Gastrointestinaltrakt bedingte Erhöhung des Blutflusses in der Schleimhaut und Verstärkung der Widerstandsfähigkeit der Mukosa sollen die schädlichen Effekte einer Hemmung der Prostaglandin-Synthese ausgleichen [Moncada, 1991; Wallace, 1995 b; Del Soldato, 1999].

1.4.1 Entwicklung COX-2-selektiver NSAIDs

In den vergangenen Jahren sind verschiedene selektive COX-2-Inhibitoren mit signifikant geringeren gastrointestinalen Nebenwirkungen entwickelt worden, die zudem potente anti-inflammatorisch wirksame Substanzen darstellen [Ziakas, 2005]. Jedoch zeigte sich kürzlich, dass auch sie einige bedeutende Nachteile aufweisen. Merck und Pfizer berichten z.B. von ernsten kardiovaskulären Zwischenfällen in Verbindung mit den selektiven COX-2-Hemmern Rofecoxib und Celecoxib, was sogar dazu führte, dass Merck Rofecoxib vom Markt nahm [Ho, 2006]. Zusätzlich bestätigten klinische Studien keinen signifikant positiven Effekt für selektive COX-2-Inhibitoren wie Rofecoxib und Celecoxib bei Patienten mit leichter bis mittelschwerer AD [Zimmermann, 2005]. Eine mögliche Ursache für das Scheitern dieser Studien äußerten Weggen *et al.* [2001], die zeigen konnten, dass bestimmte NSAIDs wie Indometacin, Ibuprofen und Flurbiprofen selektiv die $\text{A}\beta_{42}$ -Bildung vermindern können, eine Fähigkeit, die sie für selektive COX-2-Inhibitoren ebenso wie einige andere nichtselektive NSAIDs nicht nachweisen konnten. Der Einsatz von selektiven COX-2-Inhibitoren in der Therapie von AD erscheint daher insgesamt fragwürdig.

1.4.2 Entwicklung von NO-freisetzender NSAIDs

1.4.2.1 Allgemeines über NO

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein zweiatomiges Radikal, das u.a. eine bedeutende **physiologische Rolle** im Nerven-, kardiovaskulären und Immunsystem spielt, aber auch einen wichtigen Regulator zellulärer Prozesse darstellt [Feldman, 1993; Burgaud, 2002]. Im ZNS fungiert NO z.B. als Mediator neurologischer Signale mit vielen verschiedenen Funktionen einschließlich Gedächtnisbildung und Schmerzmodulation. Im peripheren Nervensystem dagegen ist es an der Regulation verschiedener gastrointestinaler, respiratorischer und urogenitaler Funktionen beteiligt [Burgaud, 2002].

NO wird von drei Isoformen der NO-Synthase (NOS) aus L-Arginin gebildet:

- von der konstitutiven neuronalen und endothelialen NOS (*nNOS* und *eNOS*), welche NO in nanomolaren Mengen freisetzen, die wichtig sind für Zellfunktion, Gewebeprotektion, Neurotransmission im ZNS, Vasodilatation und Inhibition der Plättchenaggregation
- von der induzierbaren NOS (*iNOS*), die große Mengen an NO bildet und als Teil der Immunantwort verantwortlich ist für die Zerstörung eingedrungener Pathogene [Bandarage, 2001]

Konstitutiv im Gewebe z.B. im GI-Trakt von der **eNOS** und der **nNOS** gebildetes NO scheint eine Schlüsselfunktion in der Aufrechterhaltung der Gewebeintegrität und der Zytoprotektion gegen schädliche Stimuli zu besitzen, wahrscheinlich synergistisch mit den zytoprotektiven Prostaglandinen. NO kann z.B. verschiedene gastrointestinale Abwehrmechanismen, wie Erhöhung der Schleimsekretion [Brown, 1992] und Inhibition der proinflammatorischen Aktivitäten von Neutrophilen und Blutplättchen, verstärken und als wichtiger Mediator des vaskulären Tonus eine gesteigerte Schleimhautdurchblutung erreichen [Brown, 1992 und 1993; Whittle, 1993; Wallace, 1993; Moncada, 1993; Bandarage, 2001; Ziakas, 2005]. Die NO-Bildung in Blutplättchen und in den Endothelzellen der Blutgefäße spielt über vasodilatorische Prozesse auch eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Blutdrucks. Weiterhin kann NO die Plättchenaggregation inhibieren und deren Adhäsion an die Gefäßwände verhindern, wobei eine Obstruktion der Blutgefäße und damit die Gefahr eines Infarktes vermindert wird [Burgaud, 2002].

Im Rahmen der Stimulation des Immunsystems trägt von der **iNOS** gebildetes NO in hohen Konzentrationen zur verstärkten Wirkung bestimmter Immunzellen gegen Tumorzellen, Bakterien, Viren oder andere eingedrungene Mikroorganismen bei [Schmidt, 1994 a; Burgaud, 2002]. Es kann die Aktivierung inflammatorischer Zellen kontrollieren und ist aktiv an anderen Mediatoren entzündlicher Vorgänge [Burgaud, 2002]. Während NO in hohen Dosen zytotoxisch wirkt [Schmidt, 1994 b], kann es in niedrigen Konzentrationen in vielen verschiedenen Zellmodellen die Apoptose hemmen [Johal, 2000; Prosperi, 2001].

Eine der wichtigsten physiologischen Funktionen von NO ist die **Aktivierung der „löslichen Guanylatzyklase“** (soluble guanylyl cyclase, sGC), was zur Erhöhung der intrazellulären Konzentration des second messengers **cGMP** führt [Gibb, 2001; Cary, 2005; Mitchell, 2005]. Die dafür benötigten geringen Mengen an NO werden von den konstitutiven Enzymen eNOS und nNOS gebildet und ermöglichen so eine Signaltransduktion in den Geweben. In vielen Geweben folgt die Aktivierung der NOS, Erhöhung der cGMP-Level und NO/cGMP-Signaltransduktion als Konsequenz einer Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren oder muskarinergen Rezeptoren [Hanley, 1978; Garthwaite, 1989]. Dem NO/sGC/cGMP-Signaltransduktionssystem wird daher eine wichtige Rolle bei der Modulation der synaptischen Transmission und Plastizität bestimmter Hirnregionen wie Hippocampus und Neocortex zugesprochen, die wichtig für Lernprozesse und Gedächtnisbildung sind [Thatcher, 2006]. Die NO-stimulierte sGC-Aktivität erscheint drastisch gesenkt im

Neocortex und Hippocampus von Patienten mit AD, von abnormaler Signaltransduktion durch NO wurde ebenfalls bei AD berichtet [Lu, 1999].

Unter **pathophysiologischen Bedingungen** (z.B. Entzündungsprozessen, Störungen der Ca-Homöostase) kann es durch die Aktion der iNOS zur Produktion großer Mengen an NO kommen. NO kann unter diesen Bedingungen z.B. mit reaktiven Sauerstoffspezies wie O_2^- reagieren und darüber zur Bildung weiterer toxischer Verbindungen wie Peroxynitrit ($ONOO^-$) beitragen, welches ein starkes Oxidationsmittel darstellt und aufgrund seiner hohen Reaktivität Proteine, Lipide und DNS (u.a. infolge von Strangbrüchen) schädigen kann [Duchstein, 1999; Burgaud, 2002] (s. Kap. 1.2.3. und 1.2.4). Es konnte gezeigt werden, dass NO und reaktive Stickstoffspezies z.B. auch mit Peroxidasen und Lipxygenasen interagieren und damit die Produktion von Prostaglandinen und Leukotrienen als Signalmoleküle bei inflammatorischen Prozessen beeinflussen können [Ziakas, 2005]. Bei mikroglial-induziertem Zelltod bei Nagetieren erwies sich NO als Mediator [Klegeris, 2005].

NO kann weiterhin mit eisenhaltigen Enzymen wie **Cytochrom P450** reagieren, was zu einer Inhibition der enzymatischen Aktivität führt. Die Folge ist eine Hemmung des Citratzyklus in den Mitochondrien und damit einer Hemmung der ATP-Synthese, was u.a. für die Induktion der Apoptose verantwortlich sein könnte [Schmidt, 1994 a; Murphy, 1999].

Alle drei Isoenzyme der NOS binden an das Calcium-bindende Regulatorprotein Calmodulin, wobei schon geringe Ca^{2+} -Konzentrationen zu einer Aktivierung der iNOS führen [Schmidt, 1994 a]. Für eNOS und nNOS ist ein höherer Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration nötig. Die Aktivität der Enzyme ist somit eng an die intrazelluläre Calcium-Konzentration gebunden. Die durch eine pathologisch gesteigerte, andauernde NMDA-Rezeptor-Aktivierung ausgelöste **erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration** und die über eine anschließende Aktivierung der iNOS erhöhte Verfügbarkeit von postsynaptischem NO kann über die Bildung freier Radikale und Peroxynitrit kausal zu neuronaler Schädigung führen. Als Folge des exzessiven Calcium-Einstroms in das postsynaptische Neuron können weitere Prozesse in Gang gesetzt werden, die schließlich zu Zellschäden und Apoptose führen [Thatcher, 2006].

Verschiedene Studien konnten dagegen auch **neuroprotektive Effekte von NO** bestätigen [Barger, 1995; Estevez, 1998], die mit einer Aktivierung der sGC und einer damit einhergehenden Erhöhung der cGMP-Konzentration zusammenhängen. Für cGMP

wurden protektive Effekte gegen exzitotoxische Schädigung gefunden, desweiteren eine Erhöhung der Überlebensfähigkeit von Neuronen und eine Hemmung von Enzymen einschließlich apoptotisch wirkender Caspasen [Garthwaite, 1988; Barger, 1995; Troy, 2000]. Im Gegensatz zur Rolle von NO bei oben beschriebener Neurotoxizität, kann cGMP über eine Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinasen und Ionenkanäle intrazelluläre Calcium-Level senken, die einer NMDA-Aktivierung folgen [Barger, 1995; Murad, 2004]. Einige NO-Donoren wirkten z.B. neuroprotektiv in Modellen von NMDA-Rezeptor-vermittelter Neurotoxizität [Lipton, 1993; Thatcher, 2005].

Erhöhte cGMP-Konzentrationen können weiterhin z.B. zu einer Inhibition der pro-inflammatorischen Wirkung von A β auf Mikroglia im Rahmen der AD führen [Paris, 2000]. Die neuroprotektiven Effekte können sowohl über cGMP-abhängige als auch – unabhängige Prozesse vermittelt werden.

NO besitzt also eine große Zahl an biologischen Aktivitäten, welche, zusammen mit den verschiedenen und nicht vollständig verstandenen chemischen und biochemischen Eigenschaften, Schwierigkeiten bereiten die physiologische und pathophysiologische Rolle von NO im Organismus zu verstehen.

1.4.2.2 Organische Nitrate

Organische Nitrate wie z.B. Glyceroltrinitrat (GTN), Pentaerythritoltetranitrat (PETN) sowie Isorbid-5-mononitrat (5-ISMN) und -1,5-dinitrat (1,5-ISDN) werden schon seit langem erfolgreich in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen wie Angina pectoris eingesetzt. Im Gegensatz zu direkten NO-Donoren wie Nitrosothiolen oder Diazoniumdiolaten sind Nitrate an eine vorausgehende reduktive Bioaktivierung gebunden. Es wird jedoch noch kontrovers diskutiert, ob diese Bioaktivierung je nach Organonitratstruktur über die mitochondriale Aldehyd-Dehydrogenase-2 (ALDH-2), Cytochrom P450 oder vielleicht andere Enzyme verläuft.

Thatcher *et al.* [2004, 2005] bezeichnen organische Nitrate eher als „**NO-Mimetika**“, da die biologische Aktivität der Verbindungen zwar der von NO sehr ähnlich ist, allerdings keine Sicherheit besteht, dass wirklich NO und nicht auch andere Stickoxidverbindungen verantwortlich für bestimmte Wirkungen sind.

1.4.2.3 NSAID-Organonitrat-Hybridsubstanzen

NO-freisetzende nicht-steroidale anti-inflammatorisch wirkende Substanzen vereinen die pharmakologischen Aktivitäten von NSAIDs (z.B. entzündungshemmend, schmerzhemmend) mit denen von NO (z.B. vasodilatierend, antimikrobiell, immunmodulatorisch). Sie zeigen einen signifikant verbesserten therapeutischen Index im

Vergleich zu den Original-NSAIDs, was hauptsächlich auf eine fehlende gastro-intestinale Toxizität zurückzuführen ist.

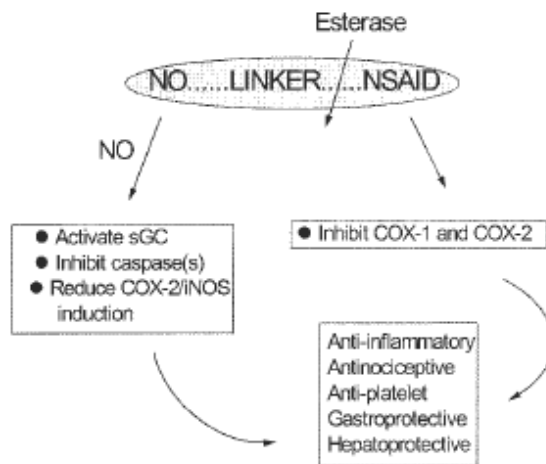


Abb. 1.32: Potenzielle molekulare Targets für NO und NSAIDs und ihre hauptsächlichsten pharmakologischen Effekte nach enzymatischer Spaltung durch Esterasen (Abb. aus [Keeble, 2002])

NO-Freisetzung in der Mukosa antagonisiert den Effekt der COX-Inhibition durch NSAIDs auf verschiedene Weise. Möglich sind z.B.

- eine Vasodilatation zur Erhöhung der Blutversorgung der Mukosa,
 - Inhibition der Leukozyten-Adhäsion und Reifung,
 - Inhibition der durch Inaktivierung von Caspasen vermittelten Apoptose
- [Keeble, 2002].

NO-NSAIDs sind im doppelten Sinne **Prodrugs**, da die Estergruppe zunächst durch Esterasen gespalten werden muß, was zur Entstehung eines NSAIDs und eines aliphatischen Nitrats führt, wobei letzteres zur Entfaltung einer „NO-mimetischen“ Wirkung noch bioaktiviert werden muss [Thatcher, 2004] (s.v.).

Verschiedene Verbindungen wie z.B. Flurbiprofen-, Ketoprofen- und Naproxen-Nitrooxybutylester, Naproxen-Nitrooxyethylester, NO-ASS, -Ibuprofen und -Paracetamol, sowie Nitrofenac wurden bereits veröffentlicht und zeigten einen der Muttersubstanz vergleichbaren bis stärkeren anti-inflammatorischen Effekt [Reuter, 1994; Davies, 1997; Al-Swayeh, 2000 a,b; Jain, 2004] bei gleichzeitig geringeren gastrointestinalen Nebenwirkungen. Hawkey [2000] konnte zeigen, dass nach Administration verschiedener NO-NSAIDs über einen Zeitraum von 14 Tagen keine Beweise gastrointestinaler Schädigungen auftraten. Man kann daher schlußfolgern, dass die Einführung einer NO-

gebenden Gruppe die ulzerogenen Eigenschaften der Substanzen merklich reduzieren kann ohne dabei allerdings ihre Effektivität als anti-inflammatorische bzw. COX-hemmende Verbindungen zu vermindern [Wallace, 1994 b, 1995 b].

Das **gastrointestinale Nebenwirkungsprofil** erwies sich z.B. bei der NO-freisetzenden Verbindung Naproxen-2-Nitrooxyethylester (LE-EK06) als wesentlich günstiger im Vergleich zur Ausgangssubstanz Naproxen. Die Nitratverbindung führte nach 21-tägiger Behandlungsdauer der Versuchstiere nur zu einer milden Schädigung der Schleimhaut im Vergleich zu Naproxen (s. Abb. 1.33) [Jain, 2004]. Ähnliche Effekte wurden auch in einer Studie mit NO-ASS (NCX-4016) an gesunden Freiwilligen beobachtet [Fiorucci, 2003].

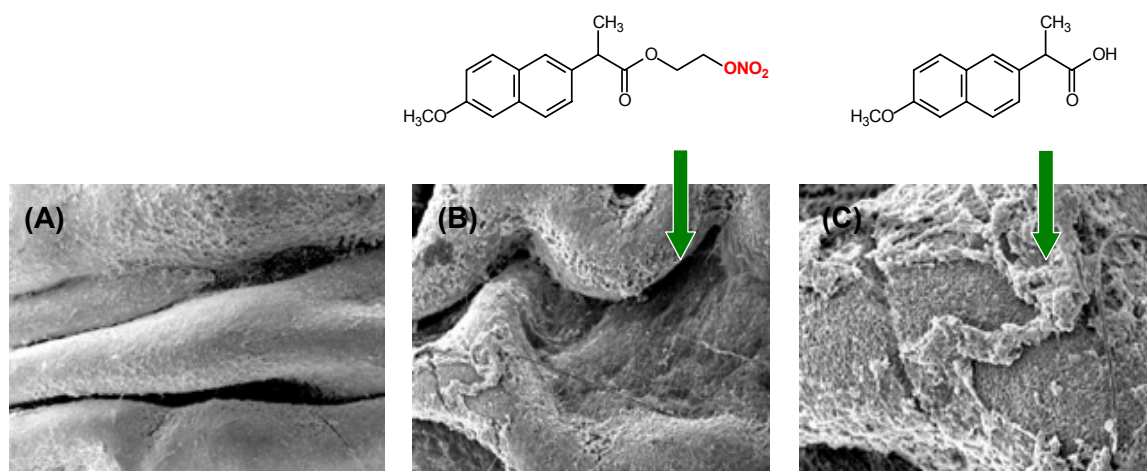


Abb. 1.33: Elektronenmikroskopische Darstellung des Magenepithels der Versuchstiere (Ratten) nach nach Behandlung mit A) Kontrollvehikel, B) LE-EK06 (9,45 mg/kg) und C) Naproxen (6,82 mg/kg); (Abb. aus [Jain, 2004])

NO-NSAIDs wie z.B. NO-Flurbiprofen führten nicht wie das ursprüngliche NSAID zu einer Verminderung des **mukosalen Blutflusses**. Es ist daher möglich, dass die Vasokonstriktion, ausgelöst durch die Hemmung der Prostaglandin-Synthese, durch die vasodilatierende Wirkung der NO-freisetzenden Gruppe des NO-NSAIDs ausgeglichen wird [Wallace, 1995 a,b]. NO könnte dabei aus der Substanz sowohl im Gewebe als auch im Lumen freigesetzt werden. Tacheuchi *et al.* [1998] beobachteten nach Applikation von NO-ASS in den Rattenmagen einen signifikanten Anstieg der intraluminalen NO-Konzentration.

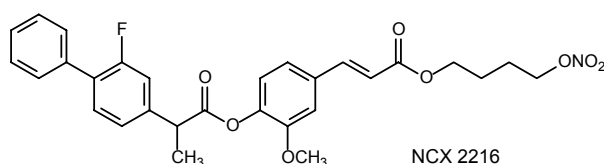
Da NO in der Lage ist, die Schleimsekretion in Mukosazellen *in vitro* und im Tiermodell zu stimulieren [Brown, 1992, 1993], könnte die Fähigkeit von NO-Flurbiprofen, die normale **Schleimsekretion** aufrechtzuerhalten, ebenfalls zu dem im Vergleich zu Flurbiprofen günstigeren Nebenwirkungsprofil beitragen.

Wichtig zu erwähnen ist allerdings, dass NO-NSAIDs trotz ihrer Wirkung auf die gastrointestinale Mikrozirkulation keine systemische Veränderung des Blutdrucks und damit Blutdruckabfall bewirken [Keeble, 2001; Burgaud, 2002]. Eine Erklärung könnte sein, dass die NO-Freisetzung aus NO-NSAIDs *in vivo* nur langsam im Vergleich zu anderen NO-Donoren wie SNAP erfolgt [Fiorucci, 2003].

Jain *et al.* [2004] berichten weiterhin, dass LE-EK06 im Tiermodell eine höhere **antinocizeptive Wirkung** zeigte als das ursprüngliche NSAID Naproxen. Gleiches wurde auch über die Nitro-Derivate von ASS und Paracetamol berichtet [Al-Swayeh, 2000 a,b], allerdings ist der Mechanismus, wie NO diese Wirkungsverstärkung vermitteln kann, noch nicht völlig geklärt.

Auch die **anti-inflammatorische Wirkung** 2 Stunden nach der Applikation des LE-EK06 war signifikant größer als bei Naproxen allein. NO scheint daher auch eine inhibitorische Wirkung auf die COX-Aktivität und die Freisetzung entzündungsfördernder Mediatoren zu besitzen [Jain, 2004]. Flurbiprofen-Nitrooxybutylester HCT-1026 zeigte zudem eine signifikante Reduktion aktivierter Mikroglia im Vergleich zu Flurbiprofen an zur Auslösung inflammatorischer Prozesse mit Lipopolysaccharid infundierten Ratten [Wenk, 2002]. Prosperi *et al.* [2001] stellten mit derselben Substanz zusätzlich eine reduzierte Produktion inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β fest, was sie mit einer eventuellen Inhibition von Caspase-1 und/oder Inhibition zellulärer Transduktionskaskaden (z.B. über NF- κ B) und/oder Aktivierung von PPAR γ erklärten - Wirkungen, die bereits für andere NSAIDs bzw. NO-NSAIDs berichtet wurden [Fiorucci, 2003; Bernardo, 2005, 2006 a,b]. Die Substanz verminderte zudem eine iNOS-Aktivierung im Magen und eine Bildung von PGE₂ im Entzündungsgebiet [Prosperi, 2001].

Das Flurbiprofen-Derivat **NCX 2216** wurde zusätzlich auch in einem doppelt transgenen Mausmodell (APP+PS1) für AD über 5 Monate auf eine mögliche A β -



senkende Wirkung untersucht. Neben der NO-gebenden Nitrooxybutylkette enthält dieses NSAID-Derivat zusätzlich noch einen antioxidativ wirkenden Linker (Ferulasäure), so dass ein Wirkungsprofil zu erwarten war, in dem die antioxidativen und anti-inflammatorischen

Eigenschaften der Ferulasäure und des Flurbiprofen kritische Schritte in der Pathogenese von AD beeinflussen und die NO-freisetzende Gruppe den Magen vor den schädlichen Effekten des NSAIDs schützen sollte [Wallace, 2004]. Die Substanz zeigte eine signifikante Reduktion der β -Amyloid-Ablagerungen, gleichzeitig aber keinerlei gastrointestinale Schädigungen trotz Inhibition der gastrointestinalen PG-Synthese [Jantzen, 2002; Wallace, 2004]. Die Behandlung mit Flurbiprofen führte dagegen zu schweren Gastroenteropathien, Kachexien und z.T. sogar zum Tod der Versuchstiere. Auch eine langanhaltende Hemmung der PG-Synthese im Gehirn konnte mit NCX 2216 festgestellt werden.

Die starke Reduktion der β -Amyloid-Ablagerungen war gleichzeitig mit einer dramatischen Erhöhung der Anzahl der aktivierten Mikroglia verbunden, was auf einen möglichen Abbau von A β durch Mikroglia schließen läßt. Die Aktivierung dieser Mikroglia könnte aus der Freisetzung von NO durch NCX 2216 resultieren. Zusätzlich zu der möglichen schädigenden Wirkung aktivierter Mikroglia bei AD, scheinen sie, zumindest in transgenen Mausmodellen, unter Umständen auch eine Funktion bei der Beseitigung der A β -Ablagerungen durch Phagozytose zu besitzen [Jantzen, 2002]. Diese Schlußfolgerung bleibt allerdings kontrovers, da bei anderen Studien eine Verminderung aktivierter Mikroglia festgestellt wurde [Thatcher, 2006].

Weitere Wirkungsmechanismen von NSAIDs werden in Kap. 1.2 diskutiert.

Die Studien mit NO-NSAIDs beweisen, dass die Verbindung des ursprünglichen NSAID-Moleküls mit einer NO-freisetzenden Gruppe zu einem verbesserten Wirk- und Nebenwirkungsprofil führt und somit für eine Langzeittherapie von AD günstiger wäre.

1.5 Zielstellung der Arbeit

Verschiedene epidemiologische Studien legten nahe, daß die chronische Einnahme nicht-steroidaler Antiphlogistika (NSAIDs) den Ausbruch der Alzheimer'schen Erkrankung verzögern kann. Unterschiedliche Wirkungsmechanismen werden in diesem Zusammenhang diskutiert. Weggen *et al.* [2001] konnten z.B. zeigen, daß bestimmte, aber nicht alle NSAIDs in der Lage sind, selektiv die $A\beta_{42}$ -Bildung, eines der pathologischen Hauptmerkmale der Alzheimer'schen Krankheit, zu vermindern. Man nimmt an, daß dies eine Folge geringfügiger Konformationsänderungen nach allosterischer Bindung dieser NSAIDs an das $A\beta_{42}$ -bildende Enzym γ -Sekretase ist [Czirr, 2006]. Besonders erfolgversprechend erschien das als Razemat bereits im Handel befindliche NSAID Flurbiprofen. Zur Zeit befindet sich das R-Enantiomer (FlurizanTM) in großen Phase III - Studien in Europa und den USA.

Aus diesen Resultaten ergaben sich die nachstehenden Zielstellungen:

Chemische Aspekte:

- 1.) *Synthese von Flurbiprofen-Derivaten mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen:*

Das Ziel dieser Arbeit bestand zunächst darin, durch strukturelle Abwandlung des ursprünglichen NSAIDs, neue und aktive Flurbiprofen-Derivate wie **1**, **2**, **3** und **4** (s. Abb. 1.34) zu synthetisieren.

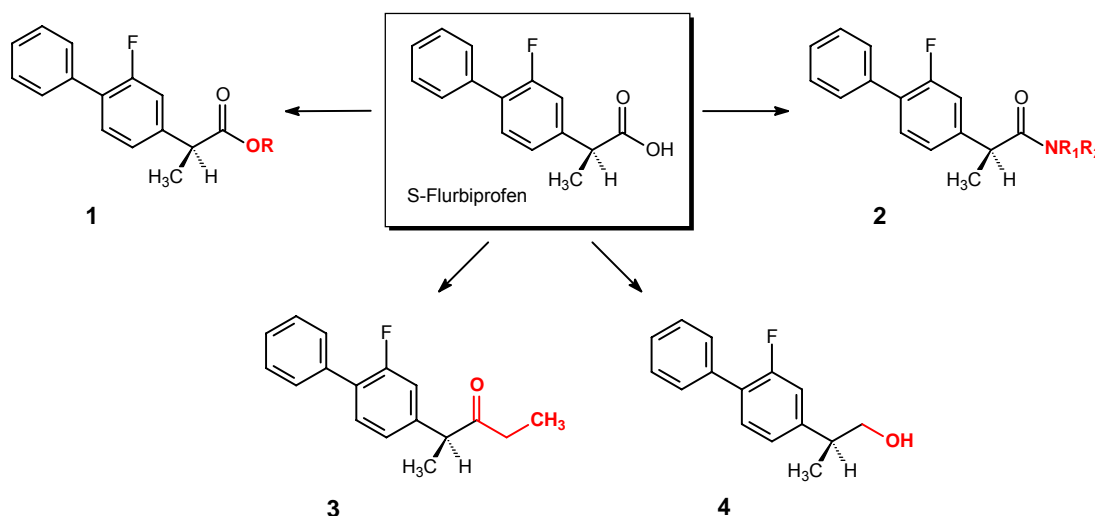


Abb. 1.34: Übersicht über die zu synthetisierenden Substanzklassen

Da das R-Enantiomer kommerziell schwer erhältlich war, sollte das leichter zugängliche S-Enantiomer eingesetzt und dessen potenzielle Nebenwirkungen durch weitere Modifikationen wie unter 2.) beschrieben, vermieden werden.

2.) *Synthese von NSAID-Organonitrat-Hybridsubstanzen:*

Aufgrund der unselektiven Hemmung der Cyclooxygenase zeigen die meisten NSAIDs, einschließlich S-Flurbiprofen, schwere gastrointestinale und renale Nebenwirkungen [Kulkarni, 2000], die ihren Einsatz in der für Alzheimer-Patienten notwendigen Langzeittherapie einschränken. Eine Strategie zur Verminderung dieser unerwünschten Nebenwirkungen ist die Darstellung von Stickstoffmonoxid freisetzenden Hybridsubstanzen, d.h. von Substanzen, die als NSAIDs bereits eine pharmakologisch definierte Arzneimittelwirkung besitzen und z.B. durch Einführung einer oder mehrerer Nitratgruppen zusätzlich in der Lage sind, NO abzugeben.

2 a.) *Synthese der Metaboliten des PETN und GTN:*

Pentaerythritoltetranitrat (PETN) und Glyceroltrinitrat (GTN) sind als Vasodilatoren zur Behandlung von Angina pectoris zugelassen. Ihr pharmakologisches und toxikologisches Profil ist daher bereits bekannt. Da sie sich nur in der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül unterscheiden, erschienen die Metaboliten des PETN, Pentaerythritol-Trinitrat (PETriN), -Dinitrat (PEDiN) und -Mononitrat (PEMN), als NO-freisetzende Komponente für NSAID-Organonitrat-Hybridverbindungen sehr geeignet. Durch das unterschiedliche Verhältnis von Nitratgruppen zu acylierbaren Hydroxylgruppen in den Metaboliten sollten Hybridmoleküle mit unterschiedlichem NSAID-Nitratgruppen-Verhältnis zugänglich sein.

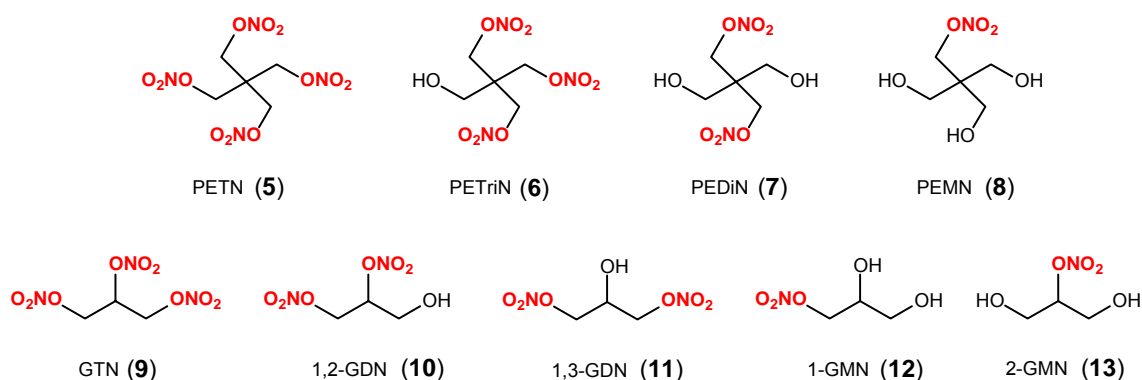


Abb. 1.35: PETN und GTN sowie deren bioaktive Metaboliten

Im Hinblick auf die Synthese von NSAID-Organonitrat-Hybridverbindungen sowie für andere Projekte sollten auch die bioaktiven Metaboliten des GTN, Glycerol-1,2- und -1,3-dinitrat (1,2- und 1,3-GDN) sowie Glycerol-1- und -2-mononitrat (1- und 2-GMN) dargestellt werden.

Die in der Literatur bislang beschriebenen Synthesen der in Abb. 1.35 abgebildeten Verbindungen sind sehr unbefriedigend. Das Ziel bestand daher darin, nach alternativen Synthesestrategien für die einzelnen Metaboliten sowie für PETN zu suchen bzw. bereits etablierte Methoden zu optimieren. Da die bioaktiven Metaboliten zum vasodilatorischen Wirkprofil von PETN und GTN beitragen, sollten diese Verbindungen auch als Referenzsubstanzen für andere Projekte im Arbeitskreis zur Verfügung stehen. Um den Reaktionsverlauf der Synthesen vor allem beim reduktiven Abbau des PETN besser verfolgen zu können, sollte hierfür eine geeignete HPLC-Methode entwickelt werden.

2 b.) Synthese von Hybridsubstanzen aus den PETN-Metaboliten und Flurbiprofen:

Aus den Metaboliten des PETN sollten anschließend Hybridverbindungen mit S-Flurbiprofen in unterschiedlichen molaren NSAID/Organonitrat-Verhältnissen dargestellt werden (s. Abb. 1.36), und zwar entweder durch Umsetzung mit dem Säurechlorid des Flurbiprofen unter Zusatz von Pyridin oder durch eine Veresterung der Nitroalkohole mit dem NSAID unter CDI-Katalyse.

Alternativ sollte eine Veresterung der Bromanaloga der Metaboliten mit Flurbiprofen, gefolgt von einer Austauschreaktion der Bromatome gegen Nitrat durchgeführt werden.

Die synthetisierten Hybridverbindungen sollten hinsichtlich ihrer Vasoaktivität bestimmt und so Zusammenhänge zwischen NSAID-Nitrat-Verhältnis und vasodilatorischer Potenz erkannt werden.

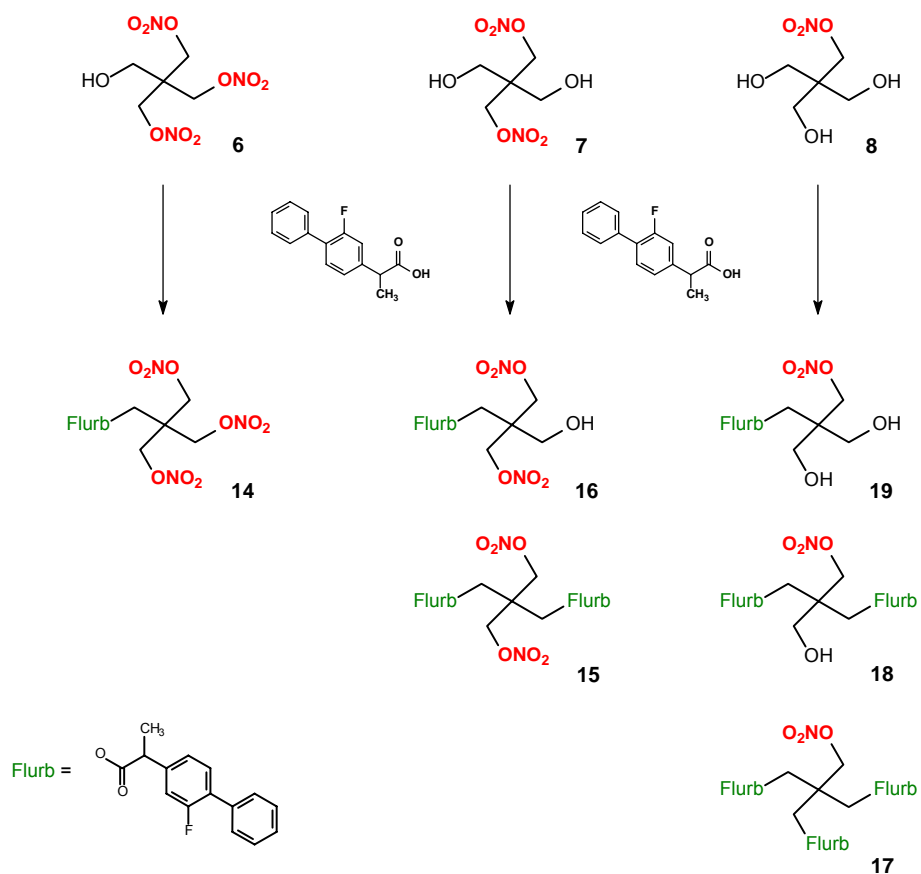


Abb. 1.36: NSAID-Organonitrat-Hybridverbindungen aus S-Flurbiprofen und PETriN, PEDiN oder PEMN

2 c.) Synthese von Hybridsubstanzen aus PEDiN und R-Flurbiprofen bzw. Indometacin

Weiterhin war die Synthese von Hybridverbindungen aus dem PETN-Metaboliten PEDiN mit R-Flurbiprofen sowie Indometacin geplant (s. Abb. 1.37 und 1.38) um eventuelle Unterschiede zwischen den beiden Enantiomeren des Flurbiprofens feststellen und den Einfluß des NSAID-Grundgerüsts im Bezug auf die vasodilatorische Potenz bestimmen zu können.

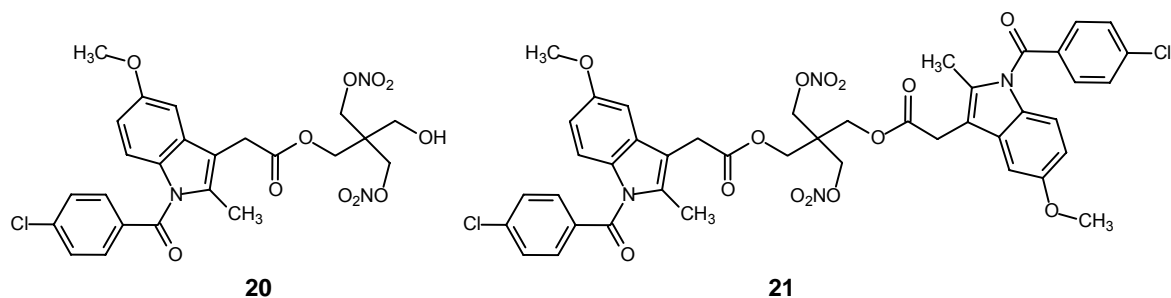


Abb. 1.37: Hybridverbindungen aus Indometacin und PEDiN

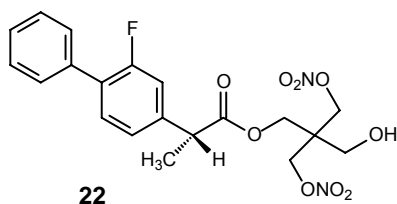


Abb. 1.38: Hybridverbindung aus R-Flurbiprofen und PEDiN

Pharmakologische Aspekte:

Ausgewählte Flurbiprofenderivate und NSAID-Organonitrat-Hybridverbindungen sollten *in vitro* und *in vivo* auf ihre biologischen Aktivitäten hin untersucht werden, und zwar sowohl innerhalb der eigenen Arbeitsgruppe als auch in Kooperation mit anderen Arbeitskreisen. Dabei erschienen folgende Bestimmungen von besonderem Interesse:

3.) *Testung auf A β -senkende Wirkung:*

Die Bestimmung der A β -senkenden Wirkung einiger ausgewählter Verbindungen sollte in Kooperation mit dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Sascha Weggen (Johannes-Gutenberg-Universität Mainz) erreicht werden.

4.) *Bestimmung der COX-1- und COX-2-Inhibition:*

Dieses Projekt sollte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Petra Froberg (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg) durchgeführt werden.

5.) *Bestimmung der NMDA-antagonistischen Wirkung:*

Als Kooperationspartner für dieses Projekt konnten Herr Kai-Uwe Schmidtke und Herr Dr. Friedemann Gaube aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Winckler (Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena) gewonnen werden.

6.) *In vivo Untersuchung der neuroregenerativen Eigenschaften einer Indometacin-PEDiN-Hybridverbindung nach experimentell induzierten Hirninfarkten bei Ratten:*

Diese Bestimmungen sollten in Kooperation mit Frau Dr. Silke Keiner aus der Arbeitsgruppe von Herrn Privatdozent Dr. med. Christoph Redeker (Universitätsklinikum für Neurologie, Jena) erfolgen.

7.) *Bestimmung der vasodilatorischen Potenz der Metaboliten von PETN und GTN sowie der Hybridsubstanzen aus 2b.) und 2c.):*

Aufgrund der NO-freisetzenden Eigenschaften der synthetisierten PETN- und GTN-Metaboliten sowie der jeweiligen Hybridsubstanzen lag eine Bestimmung der vasodilatorischen Potenz nahe. Dies sollte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Andreas König und Frau Carolin Roegler mit einem bereits am Lehrstuhl etablierten Organbad-Modell an Ringen von Pulmonalarterien des Schweins erfolgen. Dabei war es von Interesse in welchem Umfang die gefäßdilatierende Wirkung der auf dem Markt befindlichen Substanzen PETN und GTN auf die vasodilatorischen Potenzen ihrer Metaboliten bzw. auf die Gesamtzahl der verfügbaren Nitratgruppen zurückzuführen ist.

Analog sollten für die Hybridsubstanzen Zusammenhänge zwischen der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül und der vasodilatorischen Potenz, desweiteren Erkenntnisse über den Einfluß des NSAID-Grundgerüsts abgeleitet werden. Durch Vergleich der Vasoaktivität der Hybridmoleküle aus Pentaerythritoldinitrat und dem R- bzw. S-Enantiomer des Flurbiprofen könnten eventuelle Unterschiede zwischen den beiden Enantiomeren erkannt werden.

2. Synthetischer Teil

Wie in Abb. 2.1 dargestellt, war das erste Ziel dieser Arbeit verschiedene Derivate des Flurbiprofens zu synthetisieren. Dazu gehörten zunächst Ester und Amide, ebenso wie ein Keton und ein Alkohol (s. Kap. 2.1), welche zum Teil als Ausgangsstoffe für die Synthese von NSAID-Organonitrat-Hybridsubstanzen dienen sollten (s. Kap. 2.3). Wenn nicht anders angegeben, wurde mit dem S-Enantiomer des Flurbiprofens gearbeitet.

Als Organonitrat-Komponenten wurden die Metaboliten des PETN (PETriN, PEDiN, PEMN) sowie die Nitratopivalinsäure verwendet. Die Synthese der Metaboliten des PETN erfolgte durch Anpassung literaturbekannter Methoden an die Anforderungen der jeweiligen Substanz (s. Kap. 2.2). Zusätzlich sollten auch die Metaboliten des GTN, 1,2- und 1,3-GDN, sowie 1- und 2-GMN, dargestellt werden (s. Kap. 2.2).

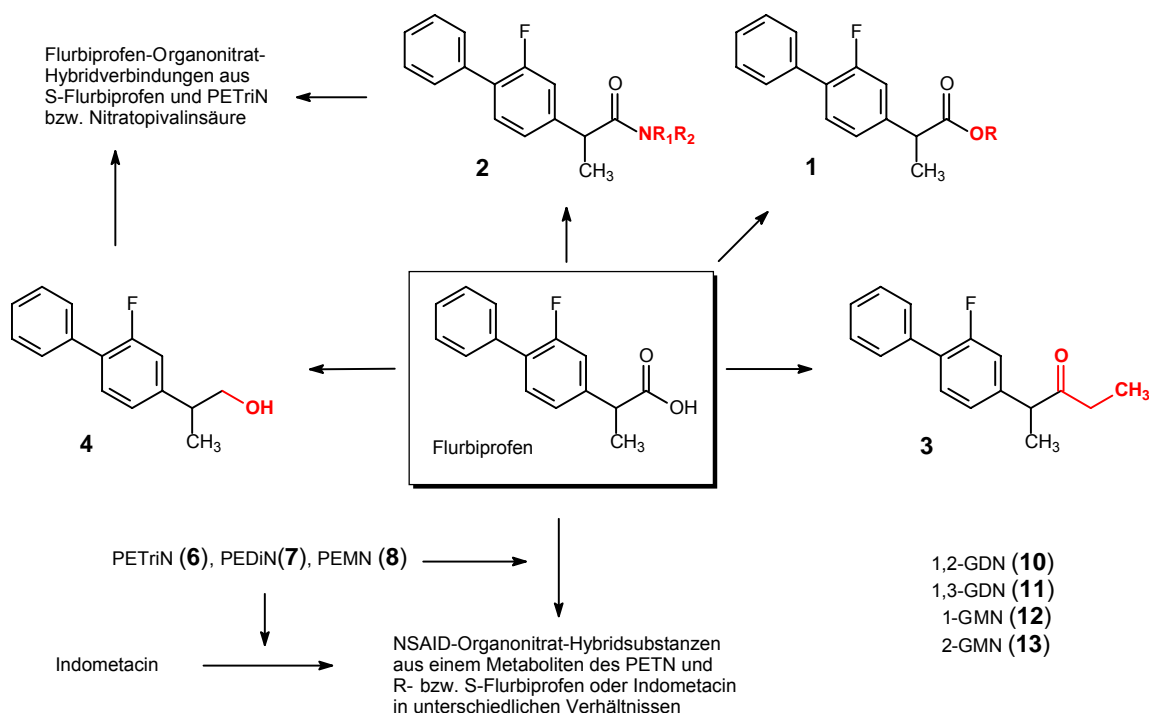
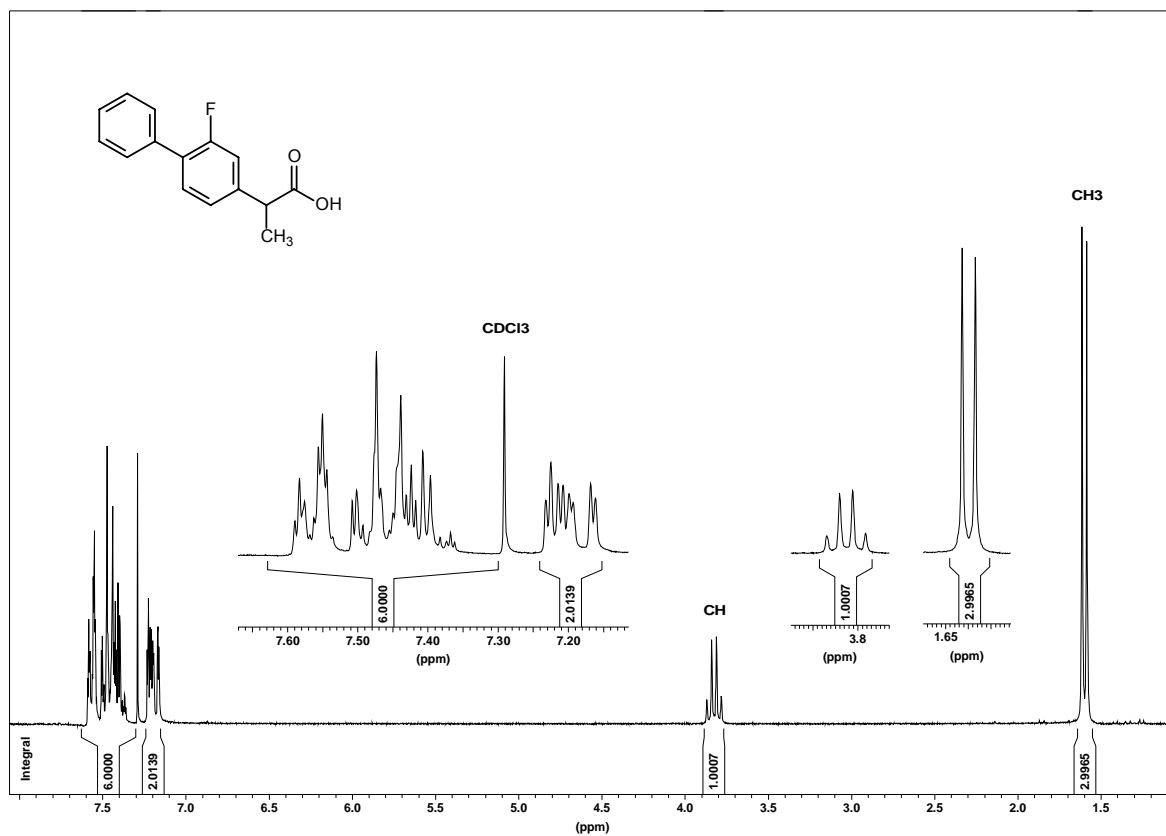
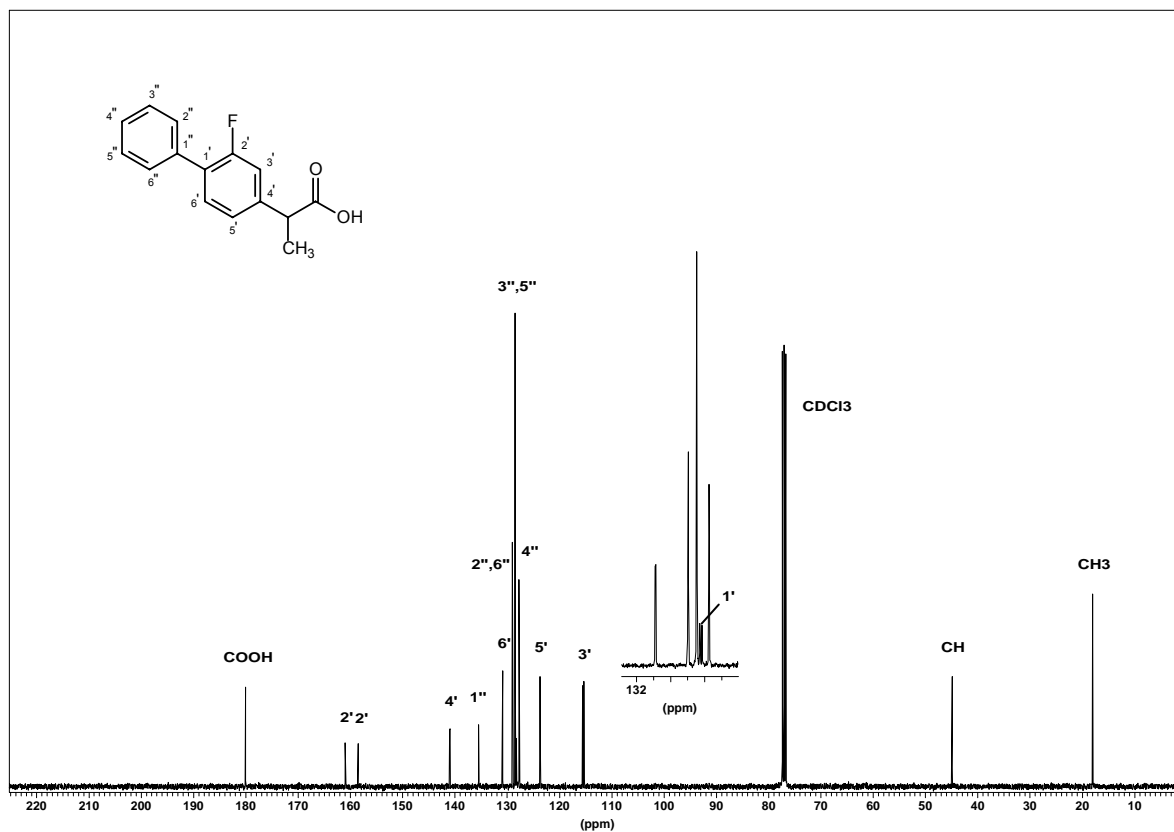


Abb. 2.1: Übersicht über die synthetisierten Verbindungen

Zum Vergleich sind im Folgenden die NMR-Spektren des Flurbiprofens abgebildet, da viele Signale auch in den Derivaten bei ähnlichen chemischen Verschiebungen auftreten.

¹H- und ¹³C-NMR von Flurbiprofen:

Die für Flurbiprofen bestimmten ¹H-NMR-Daten ergeben in CDCl₃ ein sehr übersichtliches Spektrum mit einem Bereich aus überlagerten Signalen der aromatischen Protonen von 7,16 – 7,59 ppm und zwei Signalen im Hochfeld (s. Abb. 2.2).

Abb. 2.2: ¹H-NMR von Flurbiprofen (CDCl₃)Abb. 2.3: ¹³C-NMR von Flurbiprofen (CDCl₃)

Das Signal bei 1,60 ppm ist aufgrund der Integration von 3 H den Methylprotonen zuzuordnen. Durch die Kopplung zum Methinproton erscheinen sie als Dublett mit einer vicinalen Kopplungskonstante von 7,3 Hz, welche auch im Quartett des Methinprotons bei 3,83 ppm gefunden wird. Im ^{13}C -NMR des Flurbiprofens sind deutlich die Signale der Carboxylgruppe bei 180,35 ppm, der Methingruppe bei 44,88 ppm sowie der Methylgruppe bei 18,01 ppm zu erkennen (s. Abb. 2.3).

Die Signalaufspaltung der Kohlenstoff- und Wasserstoffatome der meisten Flurbiprofen-derivate ist im Aromatenbereich vergleichbar mit der des Flurbiprofens.

2.1 Synthese monofunktionaler Flurbiprofen-Derivate

2.1.1 Synthese von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propan-1-ol (**4**)

Als Zwischenprodukt einer enantioselektiven Flurbiprofensynthese gelang Griesbach *et al.* [1997] die Darstellung von **4** über eine 6-Stufen-Synthese ausgehend von 4-Brom-2-fluorbiphenyl.

Weniger aufwendige Möglichkeiten der Herstellung ergeben sich aus der Reduktion der Carboxylgruppe des Flurbiprofens zum Alkohol. Basak *et al.* [2000] synthetisierten den Alkohol **4** durch Reduktion des Flurbiprofenmethylesters mit Natriumborhydrid in Methanol, während Adams *et al.* [1977] die gewünschte Verbindung aus dem Ethylester **23** mit Lithiumaluminiumhydrid in trockenem Ether erhielten. Letztere Variante der Synthese verlief auch im Rahmen dieser Arbeit problemlos mit einer Ausbeute von 92 %. Der erhaltene weiße Feststoff zeigte einen Schmelzpunkt von 60°C und stimmt mit dem von Griesbach *et al.* [1997] bestimmten Wert für das (S)-(+)-Enantiomer überein (59 - 60°C). Für das Razemat findet sich in der Literatur ein Schmelzpunkt von 61-63°C [Adams, 1977].

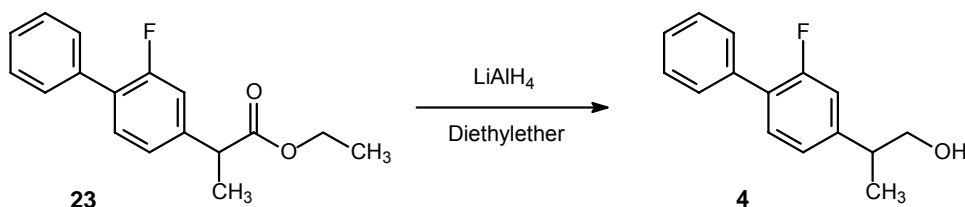


Abb 2.4: Synthese von **4** durch Reduktion mit LiAlH_4 nach Adams *et al.* [1977]

Charakteristisch im ^1H -NMR von **4** ist das Dublett bei 3,68 ppm, welches anhand der Multiplizität und der Integration von 2 H den beiden Methylenwasserstoffatomen zugeordnet werden kann, die mit dem Proton der Methingruppe mit einer vicinalen Kopplungskonstanten von $^3J = 6,8$ Hz koppeln. Eine Kopplung zur Hydroxylgruppe ist nicht sichtbar, da das Spektrum in CDCl_3 aufgenommen wurde. Für das Proton der Methingruppe erscheint ein Sextett bei 2,93 ppm, da es sowohl mit den drei Protonen der Methylgruppe als auch mit den beiden der Methylengruppe koppelt. Durch Kopplung mit dem Methinproton ergibt sich für die Methylgruppe bei 1,24 ppm ein Dublett. Die vicinale Kopplungskonstante beträgt $^3J = 7,0$ Hz.

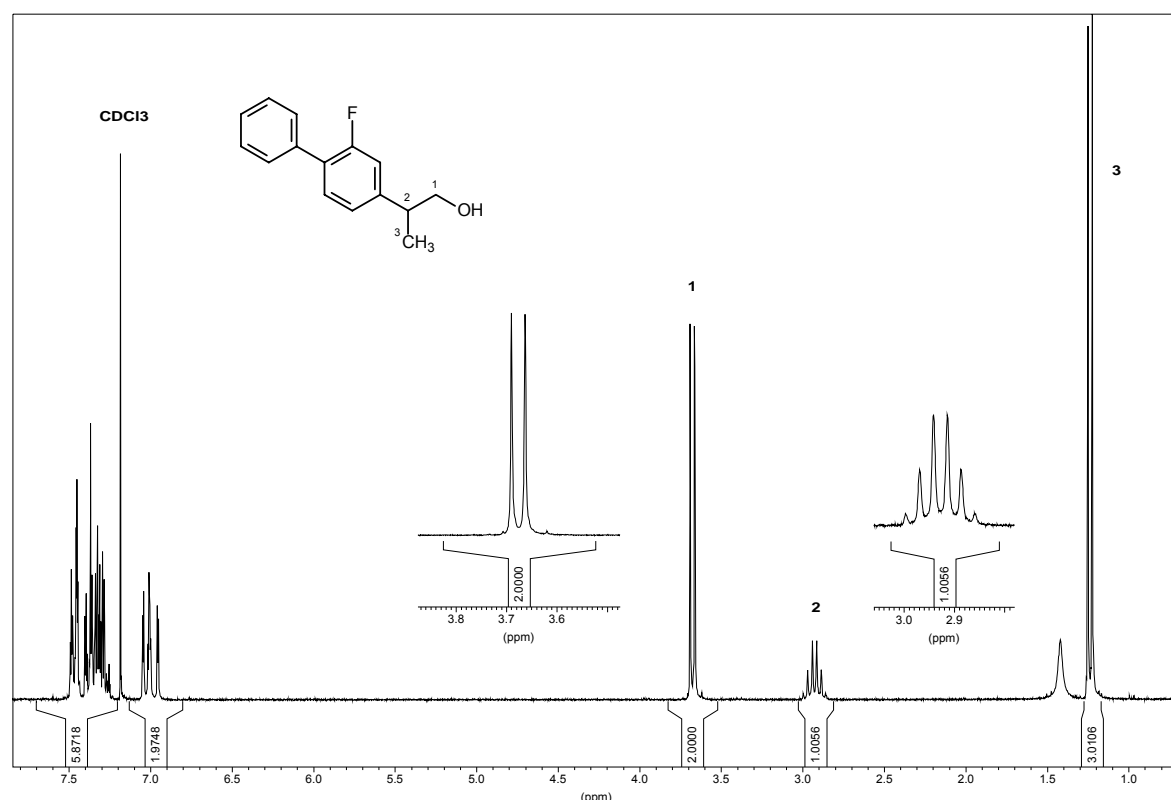


Abb. 2.5: ^1H -NMR von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propan-1-ol (CDCl_3) (**4**)

Im ^{13}C -NMR kann durch ein zusätzliches Signal bei 68,43 ppm für die Methylengruppe sowie durch das Fehlen eines entsprechenden Carboxylkohlenstoffs bei etwa 180,35 ppm (Vgl. Flurbiprofen) die Identität der Verbindung eindeutig bestätigt werden.

2.1.2 Synthese von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoylchlorid (**27**)

Die Darstellung des Säurechlorids von Flurbiprofen ist durch Umsetzung der Säure sowohl mit Thionylchlorid als auch mit Oxalylchlorid beschrieben [Garvey, 1997; Kashfi, 2005].

Mit einer Aktivierung der Säuregruppe von Arylpropionsäuren (**24**) durch Überführung in Carbonsäurechloride (**26**) lassen sich häufig mögliche Komplikationen infolge der Acidität der Carboxylfunktion umgehen. Der Hydroxysubstituent ist nicht nur bei S_N2 - sondern auch bei Additions-Eliminierungsreaktionen eine schlechte Abgangsgruppe. Um eine bessere zu schaffen, kann man die Hydroxygruppe einer Carbonsäure durch Halogene wie z.B. Chlor ersetzen. Der neue Chlorsubstituent ist eine gute Abgangsgruppe und vermindert durch seinen $-I$ -Effekt die Elektronendichte am Kohlenstoff der Carboxylgruppe, so daß ein nucleophiler Angriff hier wesentlich erleichtert wird. Das im ersten Schritt freigesetzte Proton katalysiert diese Reaktion. Intermediär entstehen Anhydride (**25**), welche jedoch nicht stabil sind.

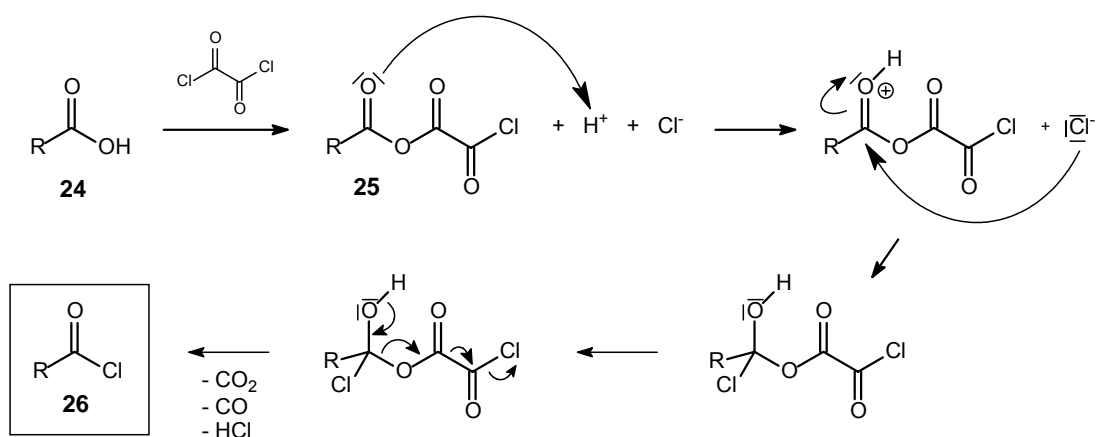


Abb 2.6: Mechanismus der Reaktion von Carbonsäuren (**24**) mit Oxalylchlorid

Garvey *et al.* [1997] führten die Reaktion mit einer Lösung aus Oxalylchlorid in Dichlormethan unter Zusatz einiger Tropfen DMF bei $0^\circ C$ durch, allerdings kann das Lösungsmittel auch variieren. Synthesen in Chloroform oder Toluol sind ebenfalls beschrieben. Die Umsetzung mit Thionylchlorid findet unter Erhitzen erfahrungsgemäß entweder ohne zusätzliches Lösungsmittel, in Dichlormethan oder auch in 1,2-Dichlorethan z.B. nach Kashfi [2005] statt. Die beschriebenen Umsetzungen verliefen nahezu quantitativ und hatten den Vorteil, daß am Ende der Reaktionszeit das überschüssige Reagenz im Vakuum entfernt werden konnte.

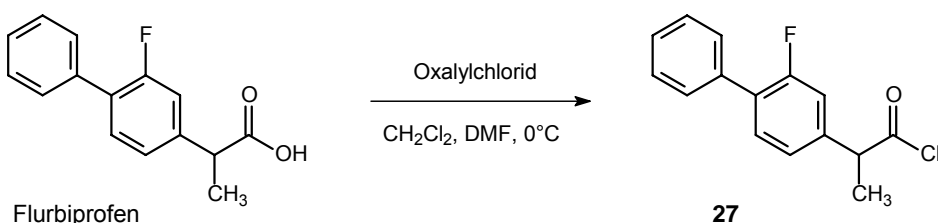


Abb. 2.7: Synthese von **27** mit Oxalylchlorid nach Garvey *et al.* [1997]

Das Säurechlorid des Flurbiprofens (**27**) wurde im Rahmen dieser Arbeit nach Garvey *et al.* [1997] durch Umsetzung von Flurbiprofen mit Oxalylchlorid als gelbe Kristalle erhalten. Da es sich hierbei um ein instabiles Zwischenprodukt handelte, wurde die Substanz vor Gebrauch frisch hergestellt und sofort weiterverarbeitet.

2.1.3 Synthese einfacher Ester des Flurbiprofens

Neben der enzymatischen Herstellung von Estern des Flurbiprofens [z.B. Bhandarkar, 2000; Ceynowa, 2003; Morrone, 2005] sind mehrere synthetische Methoden etabliert.

Die in diesem Kapitel näher betrachteten Esterderivate sind zur Übersicht in Abb. 2.8 dargestellt und wurden über die Veresterung des entsprechenden Alkohols mit Flurbiprofen unter Rückfluß und Zusatz katalytischer Mengen 96%iger Schwefelsäure synthetisiert. Unterschiede in den Reaktionsbedingungen bestanden in der Verwendung eines weiteren Lösungsmittels (Toluol), hinsichtlich der Reaktionstemperatur und -zeit, sowie der Aufarbeitung des Reaktionsgemisches. Die dargestellten Ester konnten in Ausbeuten von 57 – 88 % erhalten werden.

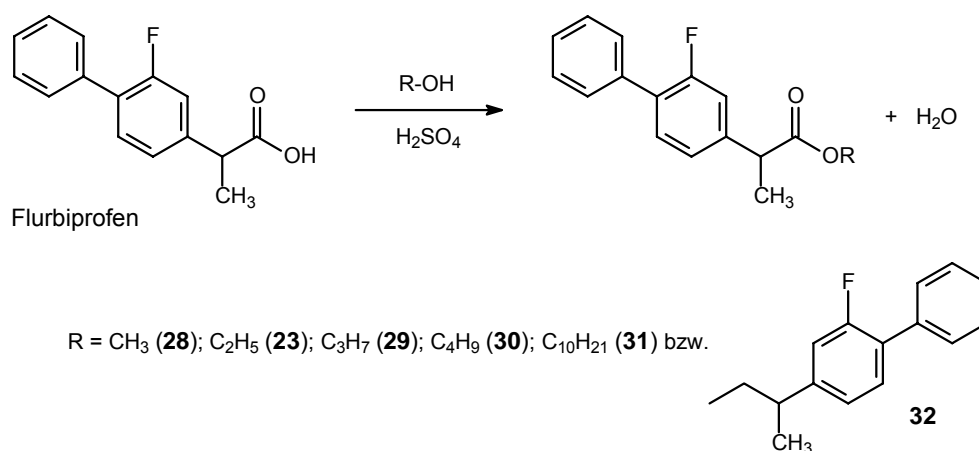


Abb. 2.8: Syntheschema für die Darstellung der Esterderivate des Flurbiprofens

Für die Synthese des Flurbiprofenmethylesters **28** sind in der Literatur mehrere Quellen angegeben. Eine Methode der Darstellung ausgehend vom Säurechlorid des Flurbiprofens mit Methanol wurde von Fujisawa *et al.* [2005] beschrieben, allerdings erhielten sie die Substanz nicht in kristalliner, sondern ölig Form in 95-100%iger Ausbeute.

Selinsky *et al.* [2001] synthetisierten den Methylester durch einfache Veresterung von Flurbiprofen mit Methanol in 64%iger Ausbeute allerdings unter Verwendung von konz. Salzsäure anstelle von Schwefelsäure.

Der Vorschrift von Pozzoli *et al.* [1996] folgend, konnte der Methylester **28** in ähnlichen Ausbeuten erhalten werden. Dabei wurde Flurbiprofen unter Zusatz von Toluol als Lösungsmittel und katalytischen Mengen konz. Schwefelsäure mit Methanol unter Rückfluß umgesetzt. Die von Selinsky *et al.* [2001] angegebenen ^1H - und ^{13}C -NMR-Daten stimmen mit den selbst ermittelten Daten überein.

Der Ethylester **23** wurde nach Adams *et al.* [1977] durch einfache Veresterung des Flurbiprofens mit Ethanol unter Rückfluß und Zusatz von konz. Schwefelsäure ohne weiteres Lösungsmittel synthetisiert und wie in der Literatur als Öl erhalten. Im ^1H -NMR ist zusätzlich zu den Signalen des Flurbiprofens deutlich die Methylgruppe der Ethylkette als Triplett bei 1,28 ppm sowie die Methylenprotonen als zentriertes Multipllett im Bereich von 4,13 – 4,26 ppm zu erkennen. Die komplizierte Signalaufspaltung des Signals der Methylenprotonen resultiert aus der Nähe zum chiralen Zentrum des Moleküls.

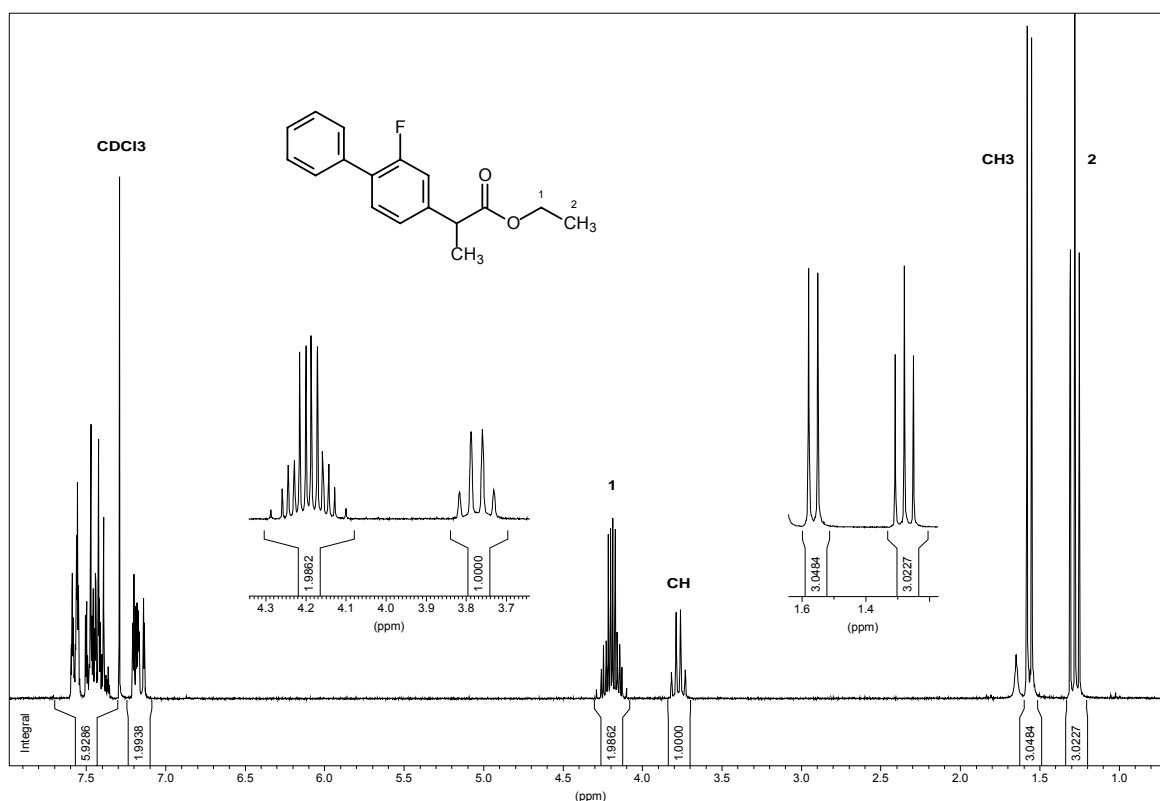


Abb. 2.9: ^1H -NMR von Ethyl (2S)-2-(2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (CDCl_3) (**23**)

Für den Propyl- (**29**) und den Butylester des Flurbiprofens (**30**) ist in der Literatur neben der enzymatischen Darstellung mit Lipasen [Bhandarkar, 2000; Ceynowa, 2003; Morrone, 2005] kein Syntheseweg beschrieben.

Diese Substanzen wurden in gleicher Weise wie der Ethylester **23** durch Veresterung des entsprechenden Alkohols mit Flurbiprofen und Zusatz von 96%iger Schwefelsäure unter Rückfluß synthetisiert, durch Extraktion mit Ether aufgereinigt und als farblose Öle in Ausbeuten von 86 bzw. 90 % erhalten.

Die NMR-Daten der Verbindung **29** stimmen mit denen in der Literatur überein [Morrone, 2005]. Das dazugehörige Spektrum ist in Abb. 2.10 dargestellt.

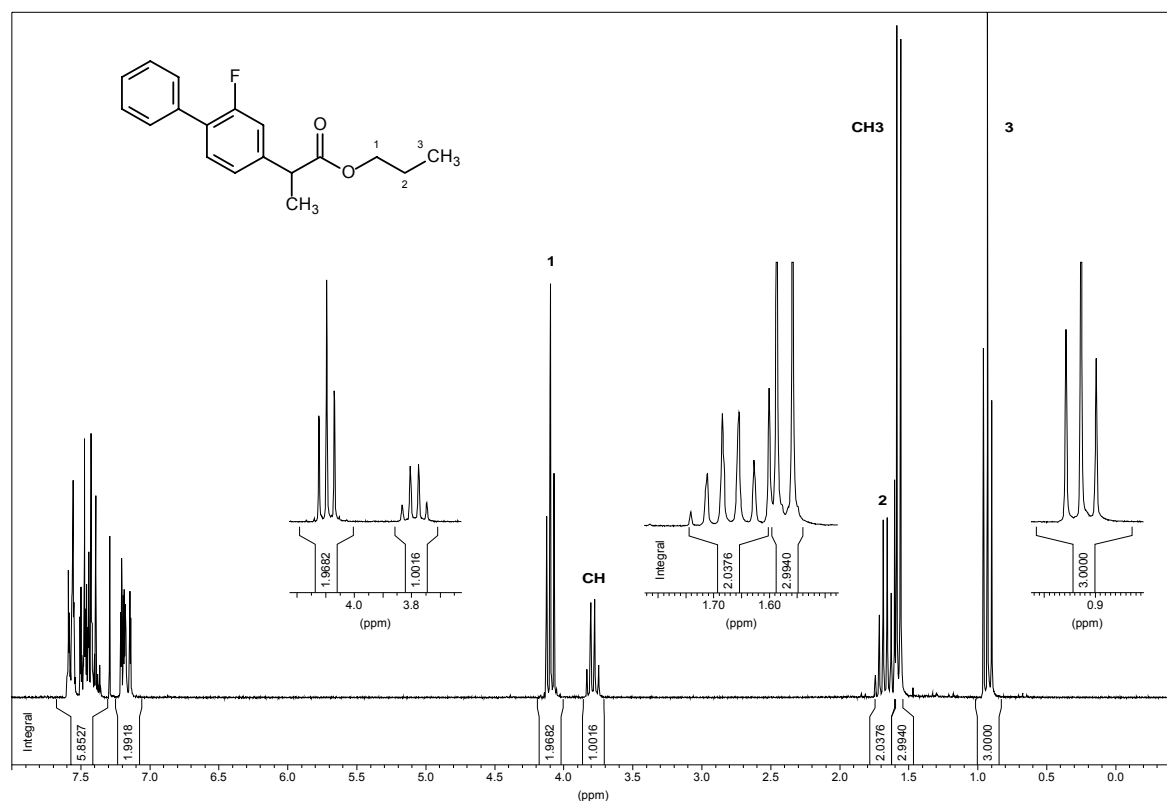


Abb. 2.10: ^1H -NMR von Propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (CDCl_3) (**29**)

Im ^1H -NMR-Spektrum des Butylesters **30** sind im Hochfeld sechs Signale zu erkennen, wobei das Dublett bei 1,56 ppm der Methylgruppe des Flurbiprofenteils und das Quartett bei 3,77 ppm der Methingruppe zuzuordnen sind. Die vicinalen Kopplungskonstanten stimmen überein (7,1 Hz). Beide Gruppen sind sowohl beim Flurbiprofen als auch bei allen Estern bei ähnlichen chemischen Verschiebungen nachweisbar.

Die Methylgruppe der aliphatischen Kette erscheint im Vergleich zur anderen Methylgruppe hochfeldverschoben bei 0,92 ppm als Triplett durch Kopplung mit den beiden benachbarten Methylenprotonen (3) mit einer vicinalen Kopplungskonstante von $^3J = 7,6$ Hz. Die Ursache dieser Hochfeldverschiebung ist der aufgrund der größeren Entfernung geringere Einfluß der Estergruppierung, welche durch ihren

elektronenziehenden Effekt eine Verringerung der Elektronendichte im Bereich der benachbarten Kerne ausübt. Die daraus resultierende Entschirmung bedingt eine Resonanz des jeweiligen Protons bei niedrigerem Feld, d.h. größerem σ -wert. Mit zunehmender Entfernung zur Estergruppe nimmt dieser Effekt jedoch ab, so daß die Signale der aliphatischen Protonen mit steigender Entfernung immer weiter im Hochfeld erscheinen. Das Signal der Methylengruppe (3) befindet sich bei 1,35 ppm leicht tieffeldverschoben als Sextett. Bei genauerer Betrachtung fällt allerdings eine Linienverbreiterung auf, die aus der unterschiedlichen Kopplung zu den benachbarten Methylen- und Methylprotonen resultiert. Es lassen sich zwei verschiedene vicinale Kopplungskonstanten von $^3J = 7,3$ Hz und $^3J = 7,6$ Hz bestimmen. Die eine ist identisch mit der vicinalen Kopplungskonstante der benachbarten Methyl-, die andere mit der der benachbarten Methylengruppe, welche als Quintett bei 1,62 ppm in Erscheinung tritt. Auch dieses Quintett ist linienerweitert und besitzt zwei vicinale Kopplungskonstanten von $^3J = 7,3$ Hz und $^3J = 6,8$ Hz. Letztere resultiert aus der Kopplung der zur Estergruppierung alpha-ständigen Methylengruppe, deren stark tieffeldverschobenes Signal bei 4,12 ppm zentriert ist. Die vicinale Kopplungskonstante beträgt ebenfalls $^3J = 6,8$ Hz.

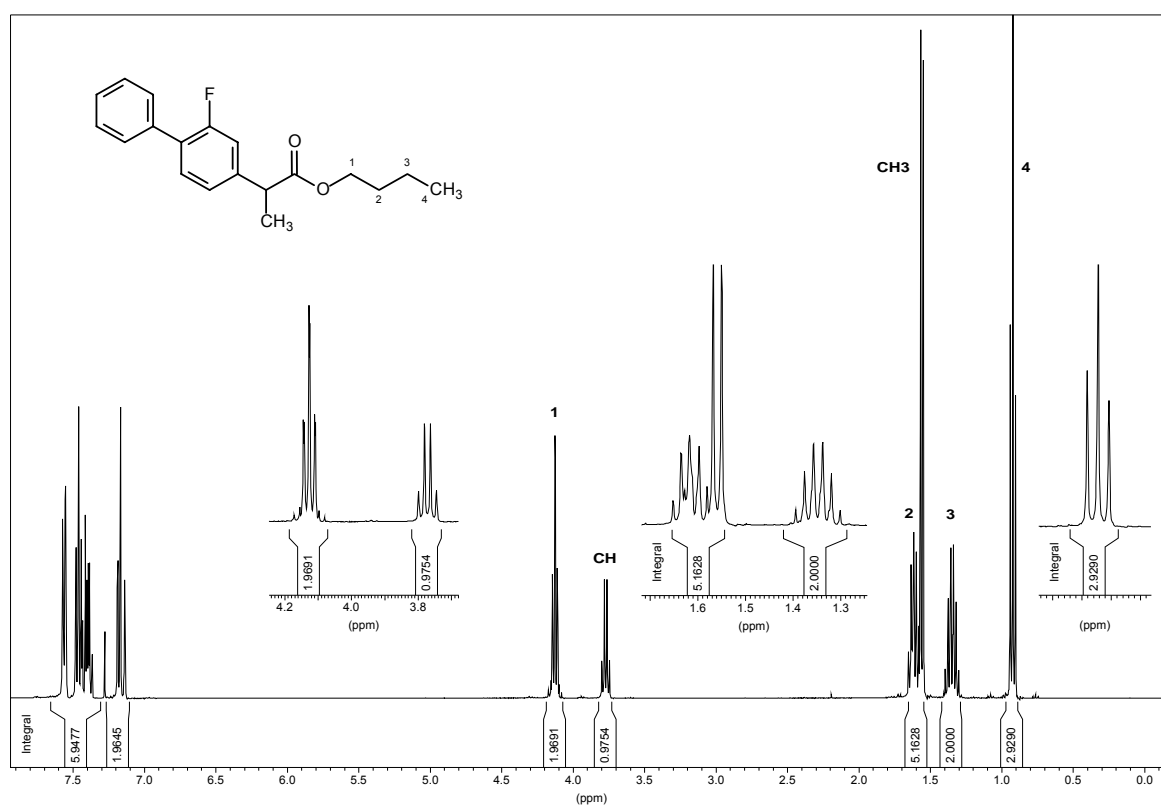


Abb. 2.11: ^1H -NMR von Butyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (CDCl_3) (30)

Der Bereich der aliphatischen Kohlenstoffatome des Butylesters von Flurbiprofen (**30**) ist in Abb. 2.14 im Vergleich mit dem ^{13}C -NMR des Decylesters **31** dargestellt.

Der Zusatz von Toluol als Lösungsmittel, wie bei Pozzoli *et al.* [1996] zur Darstellung des Flurbiprofenmethylesters **28** beschrieben, erwies sich auch bei der in gleicher Weise erfolgten Synthese von **31** vorteilhaft, da es ohne Toluolzusatz während der Veresterung zur Bildung eines Nebenproduktes mit der Molmasse 298 g/mol kam. Diese Masse konnte anhand von GC/MS-Methode A der Verbindung Didecylether zugeordnet werden. Bei Verwendung von Toluol als Lösungsmittel wurde diese Verbindung nicht gefunden und **31** konnte in einer Ausbeute von 57 % als farbloses Öl erhalten werden. Die Reinheit betrug laut GC/MS-Methode A 100 %. Das Fragment $m/z = 199$ ist charakteristisch für alle besprochenen Esterderivate des Flurbiprofen und entsteht wahrscheinlich nach Spaltung der Bindung zur Carboxylgruppe mit anschließender Umlagerung zu einem substituierten Tropyliumion der Struktur in Abb. 2.12 [Milnes, 1994].

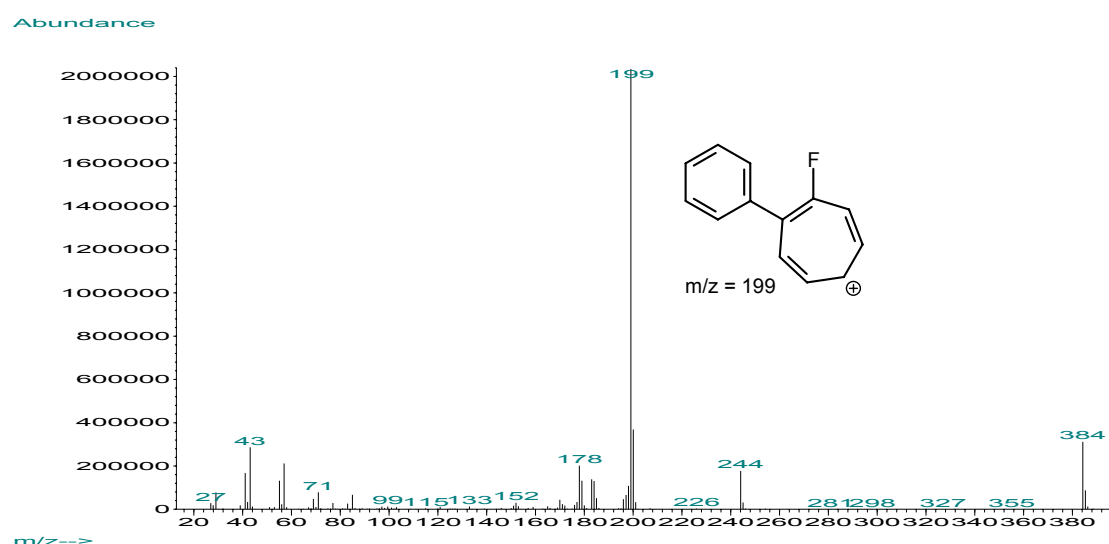


Abb. 2.12: Massenspektrum von **31** sowie Fragment mit der Masse $m/z = 199$

Das ^1H -NMR von **31** entspricht in den chemischen Verschiebungen im Wesentlichen dem von **30**, jedoch erscheinen die Signale der Methylengruppen 3-9 der aliphatischen Kette als zentriertes, singulettartiges Multiplett bei 1,26 ppm anstelle des Sextetts der gamma-ständigen Methylengruppe bei **30** (s. Abb. 2.13). Der Bereich der aromatischen Protonen von **31** und **30** entspricht sowohl im ^1H - als auch im ^{13}C -NMR dem des Flurbiprofens.

In Abb. 2.14 sind die Signale der aliphatischen Kohlenstoffatome von **31** im Vergleich mit denen der Verbindung **30** dargestellt.

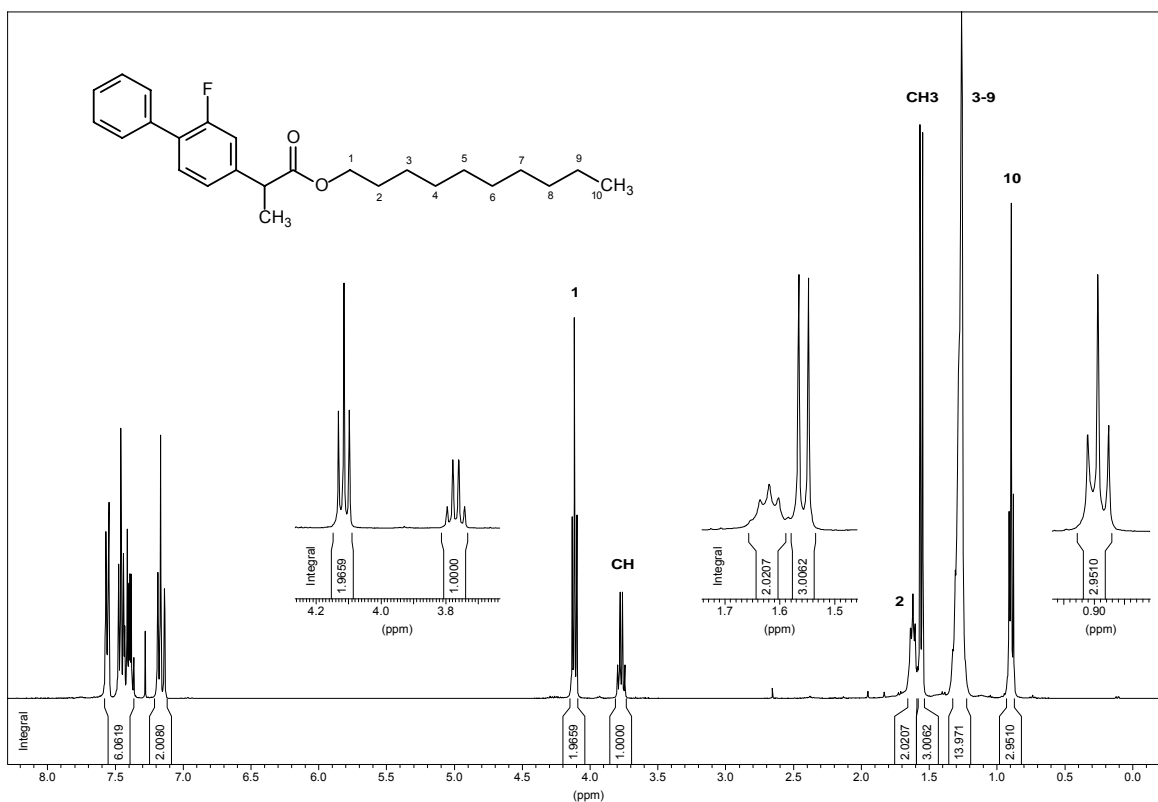


Abb. 2.13: ¹H-NMR von Decyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (CDCl₃) (31)

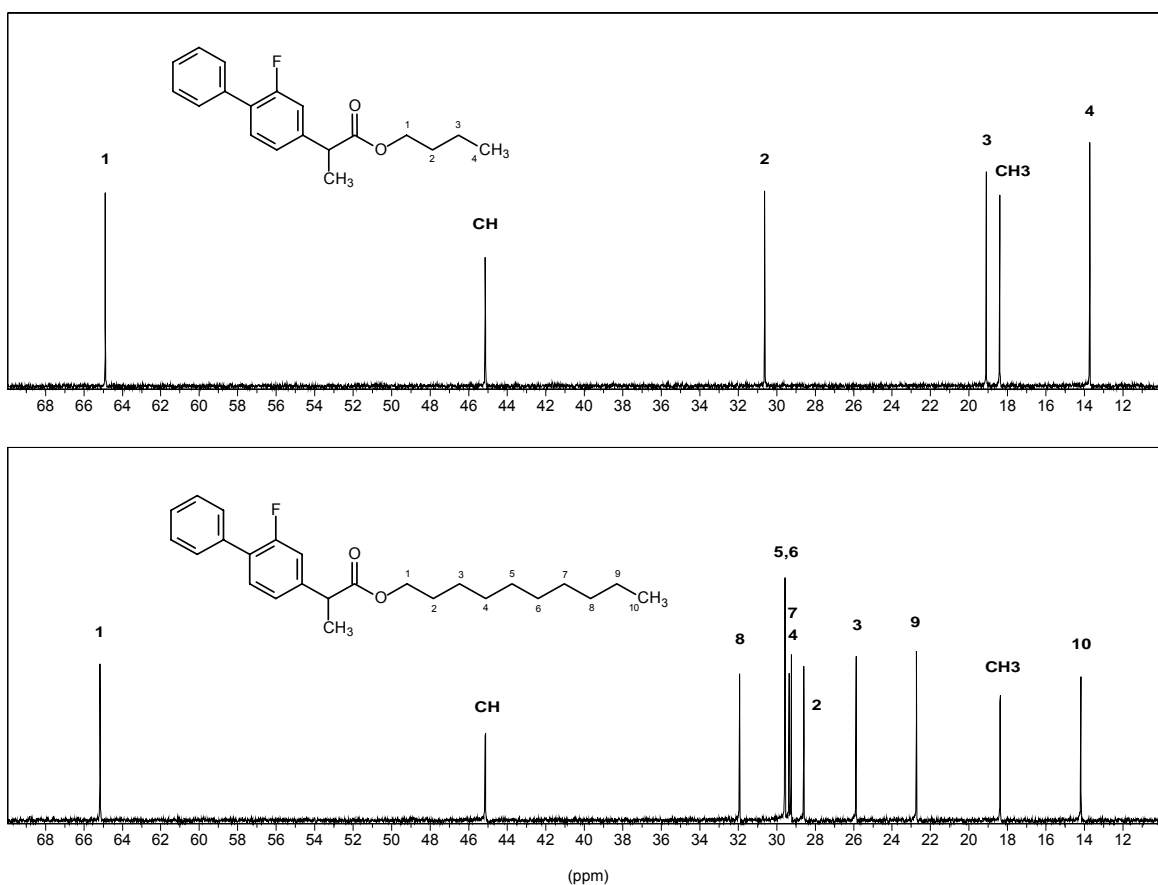


Abb. 2.14: Vergleich der ¹³C-NMR-Spektren des Butylesters 30 und Decylesters 31 von Flurbiprofen

Die Verbindung **32** konnte auf demselben Wege wie **28** und **31** (s.o.) durch Veresterung des 4-Fluor-Biphenylpropanols **4** (s. Kap. 2.1.1) mit Flurbiprofen synthetisiert werden, allerdings war aufgrund des festen Aggregatzustandes von **4** hier ein Lösungsmittel wie Toluol unbedingt erforderlich. Das zunächst erhaltene Öl kristallisierte innerhalb von zwei Tagen zu einem weißen Feststoff, dessen Identität nach Umkristallisation aus n-Hexan durch ein hochauflösendes Massenspektrum sowie ^1H - und ^{13}C -NMR bestätigt werden konnte.

Im ^1H -NMR der Verbindung **32** zeigt sich die Methylengruppe deutlich tieffeldverschoben bei 4,07 – 4,21 ppm im Vergleich zu der des Eduktes **4** (s. Abb. 2.5) bei 3,68 ppm, was auf den elektronenziehenden und damit entschirmenden Einfluß der benachbarten Estergruppierung zurückzuführen ist und ein Beweis für die erfolgreiche Veresterung darstellt. Die stärkere Aufspaltung des Signals zum Dublett von Dubletts vom Dublett ist ursächlich in der Nähe zu den chiralen Zentren zu suchen. Die beiden Protonen der Methylengruppe sind diastereotop und zeigen sowohl vicinale Kopplungen (6,5 und 7,4 Hz) mit dem benachbarten Methinproton als auch eine geminale Kopplung untereinander ($^2J = 10,9$ Hz). Durch die relativ kleine Verschiebungsdifferenz kommt es zur Überlagerung der beiden Doppeldubletts.

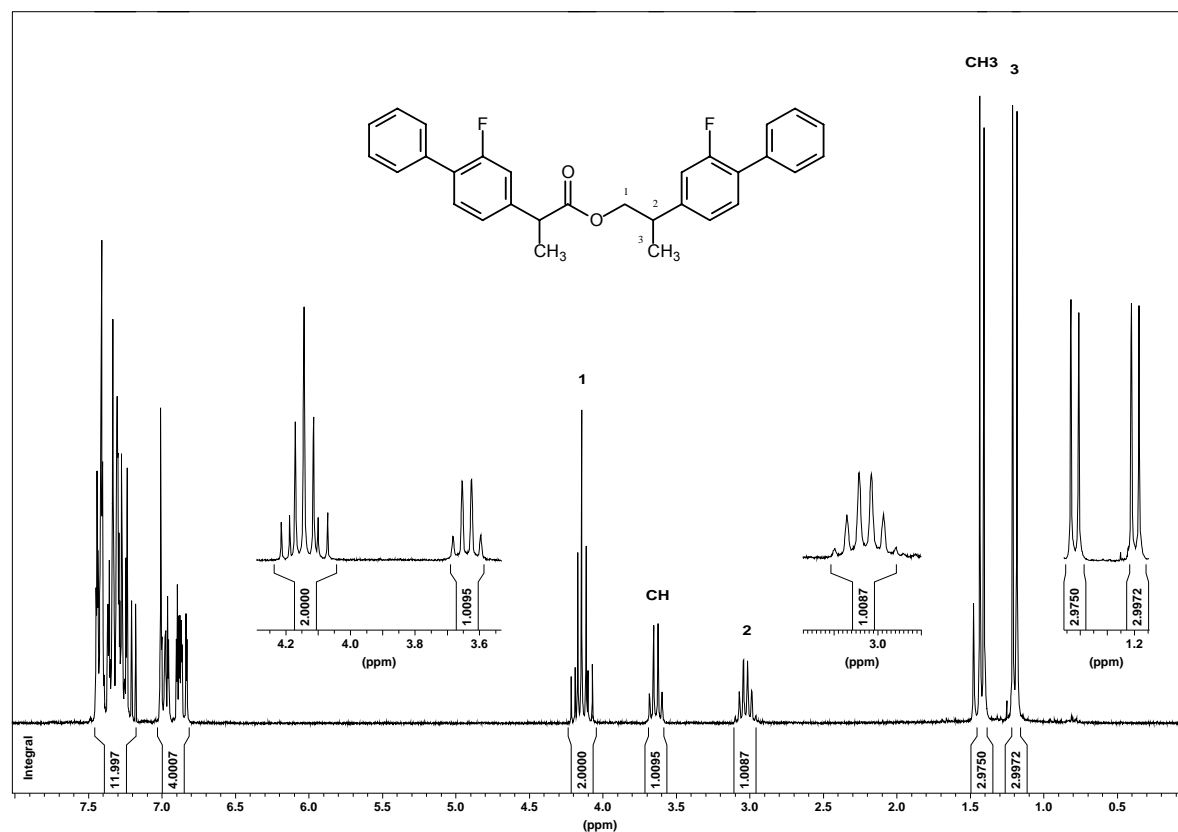


Abb. 2.15: ^1H -NMR von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (CDCl_3) (**32**)

Die beiden Methingruppen des Moleküls erscheinen durch die unterschiedliche Nachbarschaft einmal der Estergruppe und andererseits der Methylengruppe im Abstand von $\Delta\sigma = 0,61$ ppm, wobei die Methingruppe des Flurbiprofenteils durch die größere Nähe der Estergruppierung tieffeldverschoben bei 3,64 ppm sichtbar ist. Die chemische Verschiebung des anderen Methinprotons wird dagegen durch die erfolgte Veresterung kaum beeinflusst und erscheint wie bei der Ausgangsverbindung **4** als Sextett bei 3,03 ppm, was darauf hindeutet, daß der Einfluß elektronegativer Gruppen mit zunehmendem Abstand geringer wird. Durch die Kopplung mit insgesamt drei bzw. fünf Protonen ergeben sich die Multiplizitäten eines Quartetts bzw. eines Sextetts.

Die beiden Methylgruppen befinden sich in unterschiedlicher stereochemischer Umgebung und erscheinen daher als zwei getrennte Hochfeldsignale bei 1,20 und 1,42 ppm. Durch die Kopplung mit dem jeweiligen Methinproton ergeben sich Dubletts mit vicinalen Kopplungskonstanten von 7,1 bzw. 7,3 Hz, welche auch in den Signalen der jeweiligen Kopplungspartner gefunden werden.

Das ^{13}C -NMR von **32** ergibt sich nahezu aus der Überlagerung der Spektren von **4** und Flurbiprofen. Durch die Knüpfung der Esterbindung ergeben sich nur geringfügige Veränderungen in den chemischen Verschiebungen der einzelnen Kohlenstoffatome.

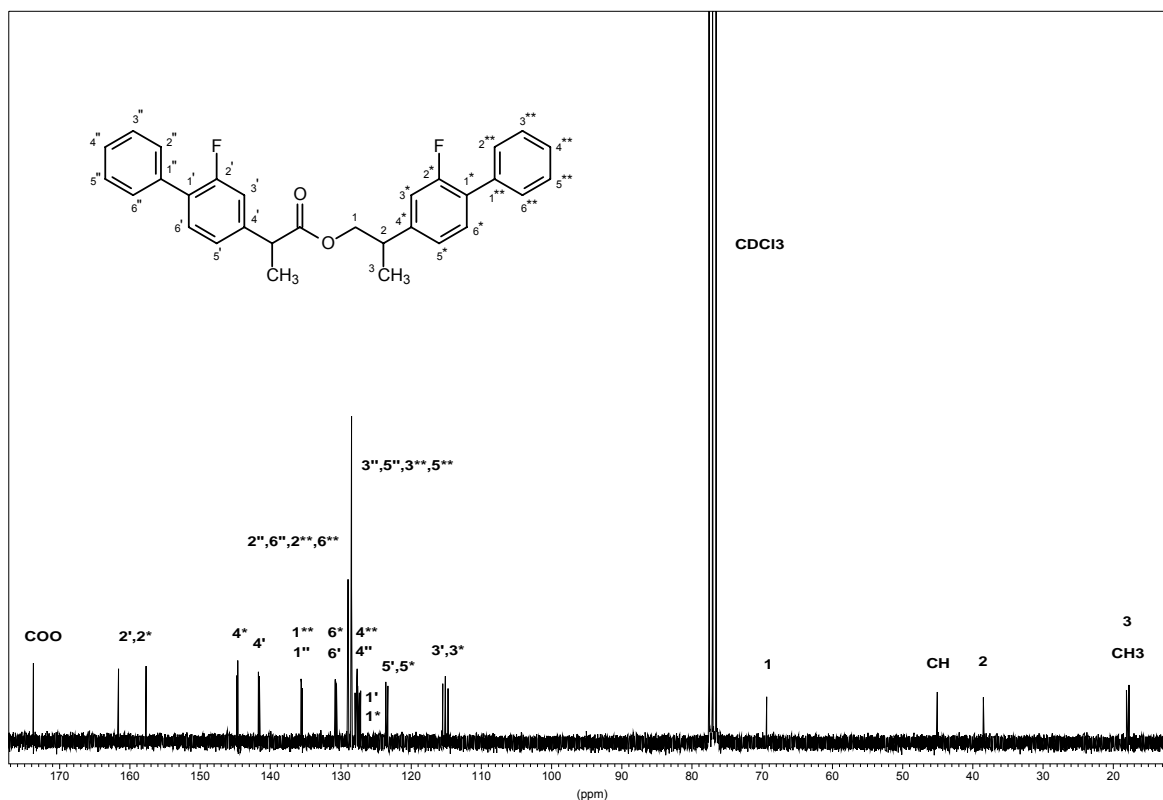


Abb. 2.16: ^{13}C -NMR von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (CDCl_3) (**32**)

Deutlich ist eine annähernd vollständige Überlagerung aller einander entsprechenden aromatischen Kohlenstoffe des Flurbiprofenteils mit denen von **4** zu erkennen - mit Ausnahme der benachbart zu den chiralen Zentren befindlichen ($4'$, 4^*).

Bei 173,74 ppm erscheint das Signal des Esterkohlenstoffatoms um 6,61 ppm hochfeldverschoben im Vergleich zu Flurbiprofen, was den schwächeren entschirmenden Effekt der Estergruppe deutlich macht.

2.1.4 Synthese von Glycerolestern des Flurbiprofens

Von den dargestellten Glycerolestern des Flurbiprofens ist die Verbindung **35** bereits Ende der 80er Jahre von Svoboda *et al.* [Svoboda, 1989] beschrieben worden. Sie synthetisierten dazu das Säurechlorid des Flurbiprofens (**27**) mit Thionylchlorid in Toluol und setzten dieses in Dichlormethan mit dem Glycerolester **33** unter Zusatz von DMAP und Triethylamin in 69%iger Ausbeute zu **35** um. Trotz Kenntnis der Arbeit von Svoboda *et al.* [Svoboda, 1989] wurde **35** im Rahmen dieser Arbeit in Anlehnung an eine Vorschrift von Bentley *et al.* [Bentley, 1970] durch Umsetzung des Säurechlorids von Flurbiprofen mit **33** unter Zusatz von trockenem Pyridin als Base dargestellt. Abweichend wurde jedoch Dichlormethan als Lösungsmittel gewählt und 3,5 statt 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Nach anschließender Extraktion und säulenchromatographischer Aufreinigung wurde ein schwach gelber Feststoff in 43%iger Ausbeute erhalten, der denselben Schmelzpunkt von 44°C zeigte wie in der Literatur beschrieben (44 – 45°C [Svoboda, 1989]). Auch die angegebenen NMR-Daten stimmen mit den ermittelten Werten überein.

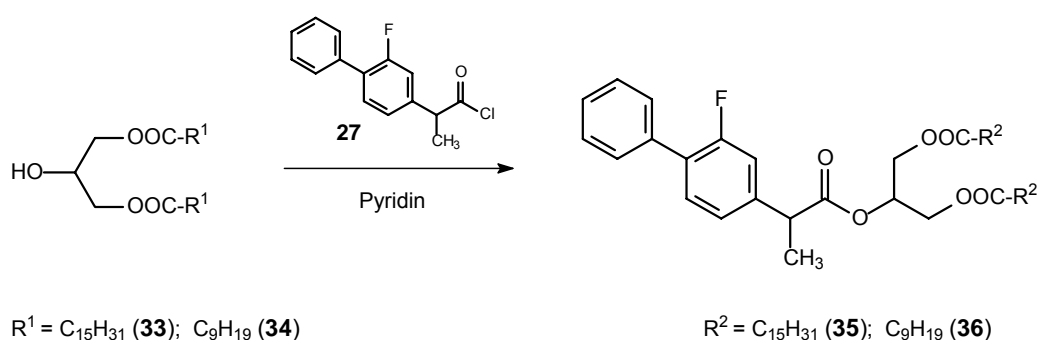


Abb. 2.17: Synthese von **35** und **36** nach Bentley *et al.* [1970]

Im ^1H -NMR von **35** ergibt das Methinproton des Flurbiprofenteils aufgrund der Kopplung zu den drei benachbarten Methylprotonen erwartungsgemäß ein Quartett bei 3,78 ppm mit einer vicinalen Kopplungskonstante von $^3J = 7,1$ Hz, welche auch im Dublett der Methylprotonen bei 1,55 ppm bestimmt werden kann.

Obwohl dieser Molekülteil achiral ist, sind die Protonen in den beiden Methylengruppen des Glycerols diastereotop, wodurch man ein sehr kompliziertes Spektrum vom Typ ABMXY im Bereich von 4,06 – 4,38 ppm mit der Integration 4 H erhält. Jedes Methylenproton (A,B,X,Y) erscheint dabei jeweils als Doppeldublett, wobei sich ein überlagertes Signal aus insgesamt 4 Dubletts vom Dublett ergibt. Die größte Kopplungskonstante bezieht sich auf die geminalen Kopplungen der Protonen untereinander und ist für beide Methylengruppen gleich ($^2J = 11,9$ Hz). Die vicinalen Kopplungskonstanten der einzelnen Methylengruppen unterscheiden sich jedoch. Für die Protonen A und B betragen sie $^3J_{AM} = 4,2$ Hz bzw. $^3J_{BM} = 5,9$ Hz. Für die Protonen X und Y lassen sich Kopplungskonstanten von $^3J_{XM} = 4,2$ Hz sowie $^3J_{YM} = 6,4$ Hz ermitteln. Die Intensitäten der einzelnen Linienpaare sind relativ ähnlich, was auf die große Entfernung der chemischen Verschiebung des vicinalen Kopplungspartners, nämlich in diesem Falle des Methinprotons 2* (M) bei 5,28 ppm, hindeutet. Dagegen zeigen die einzelnen Linien jedes Dubletts einen Dacheffekt, was aus der großen Nähe der chemischen Verschiebung des koppelnden geminalen Protons resultiert.

Das Methinproton 2* (M) des Glycerols ergibt infolge der Kopplung mit den vier nicht äquivalenten Methylenprotonen ein zentriertes Multiplett bei 5,28 ppm.

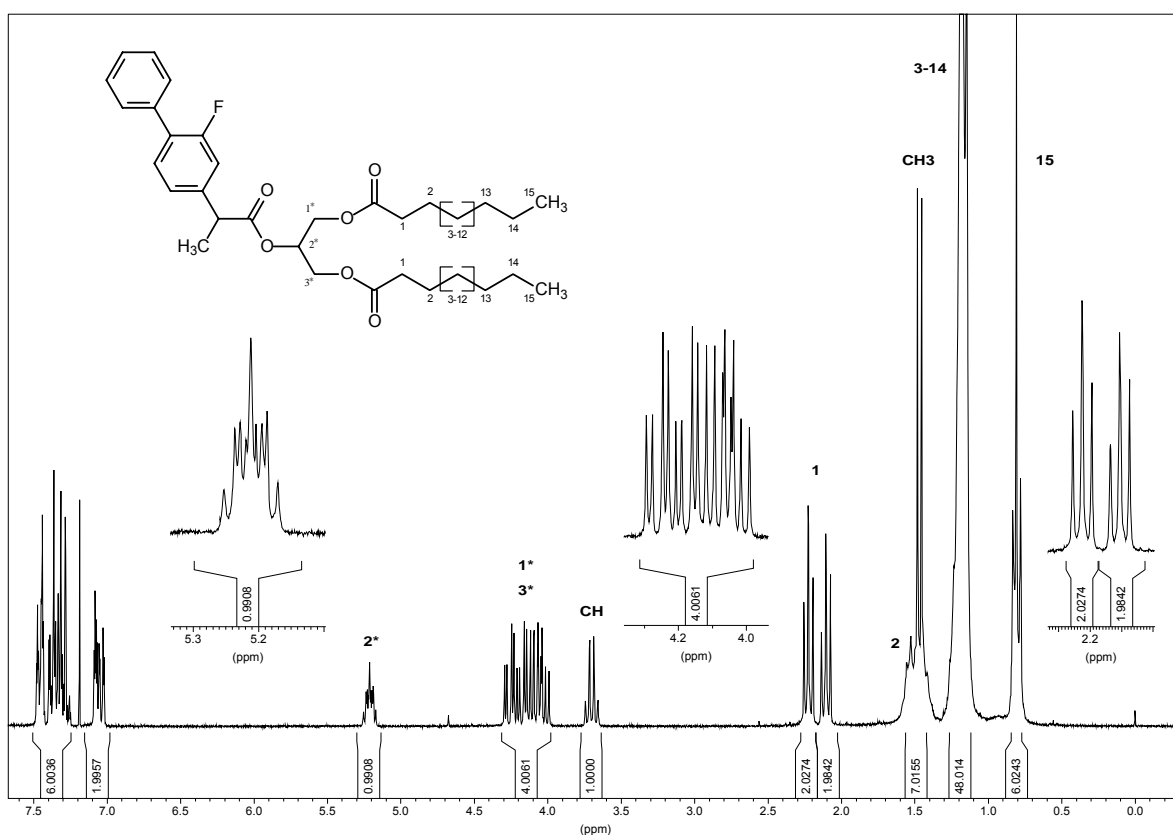


Abb. 2.18: ^1H -NMR von 2-[(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyloxy]-3-[(palmitoyloxy)propyl]palmitat (CDCl_3) (**35**)

Aufgrund von drei z.T. direkt benachbarten elektronenziehenden Estergruppen und der damit einhergehenden stärkeren Entschirmung sowohl der Methylengruppen als auch der Methingruppe des Glycerols erscheinen die Signale dieser Gruppen tieffeldverschoben im Vergleich zum Methinproton des Flurbiprofenteils.

Von den Protonen der aliphatischen Ketten sind die Signale der benachbart zu den Estergruppen liegenden Methylenprotonen am weitesten ins Tieffeld verschoben. Beide alpha-Methylengruppen sind nicht äquivalent und erscheinen als getrennte Signale bei geringfügig unterschiedlichen chemischen Verschiebungen zentriert bei 2,18 ppm bzw. 2,30 ppm. Aufgrund der Kopplung zu jeweils zwei benachbarten Protonen ist die Multiplizität eines Triplets für beide Gruppen wie erwartet. Die vicinalen Kopplungskonstanten betragen $^3J = 7,6$ Hz bzw. 7,5 Hz. Die beta-ständigen Methylengruppen ergeben durch Kopplung mit vier benachbarten Protonen ein verbreitertes und mit dem Dublett der Methylgruppe des Flurbiprofenteils überlagertes Multiplett bei 1,48 – 1,68 ppm. Noch weiter im Hochfeld ist bei 1,16 – 1,35 ppm das überlagerte Multiplett der anderen Kettenmethylenprotonen und bei 0,89 ppm das Signal der beiden endständigen Methylgruppen zu finden. Letztere ergeben durch Kopplung mit je zwei benachbarten Methylenprotonen ein Triplett mit einer vicinalen Kopplungskonstante von $^3J = 6,6$ Hz. Das Triplett weist eine deutliche Linienverbreiterung auf, was darauf hindeutet, daß beide Methylgruppen bei einer nur geringfügig unterschiedlichen Frequenz zur Resonanz kommen.

Im ^{13}C -NMR von **35** (s. Abb. 2.19 und 2.20) entspricht der Aromatenbereich von 115,01 ppm bis 161,60 ppm dem Signalmuster von Flurbiprofen. Die 3 Kohlenstoffatome der Estergruppen erscheinen fast überlagert bei den chemischen Verschiebungen 173,01 ppm, 173,13 ppm und 173,22 ppm. Der Aliphatenbereich ist zur besseren Übersichtlichkeit noch einmal in Abb. 2.20 vergrößert dargestellt.

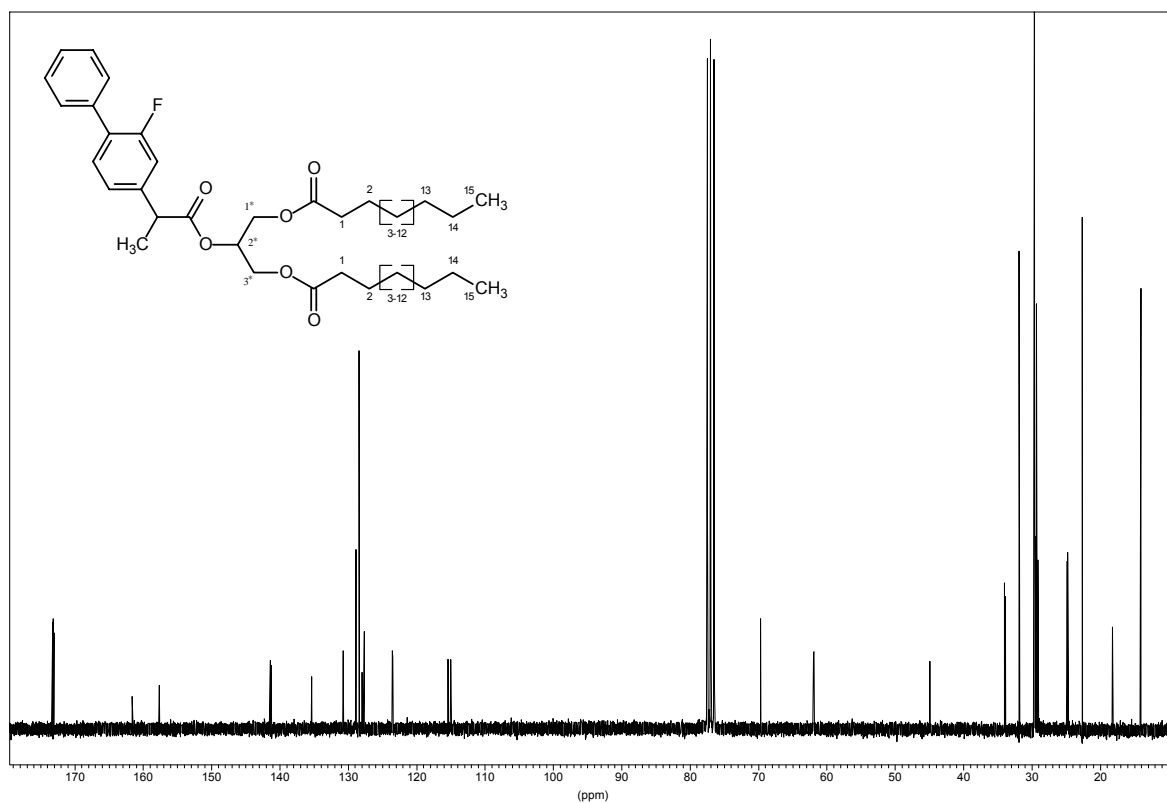


Abb. 2.19: ^{13}C -NMR von 2-[(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyloxy]-3-[(palmitoyloxy)propyl]palmitat (CDCl_3) (**35**)

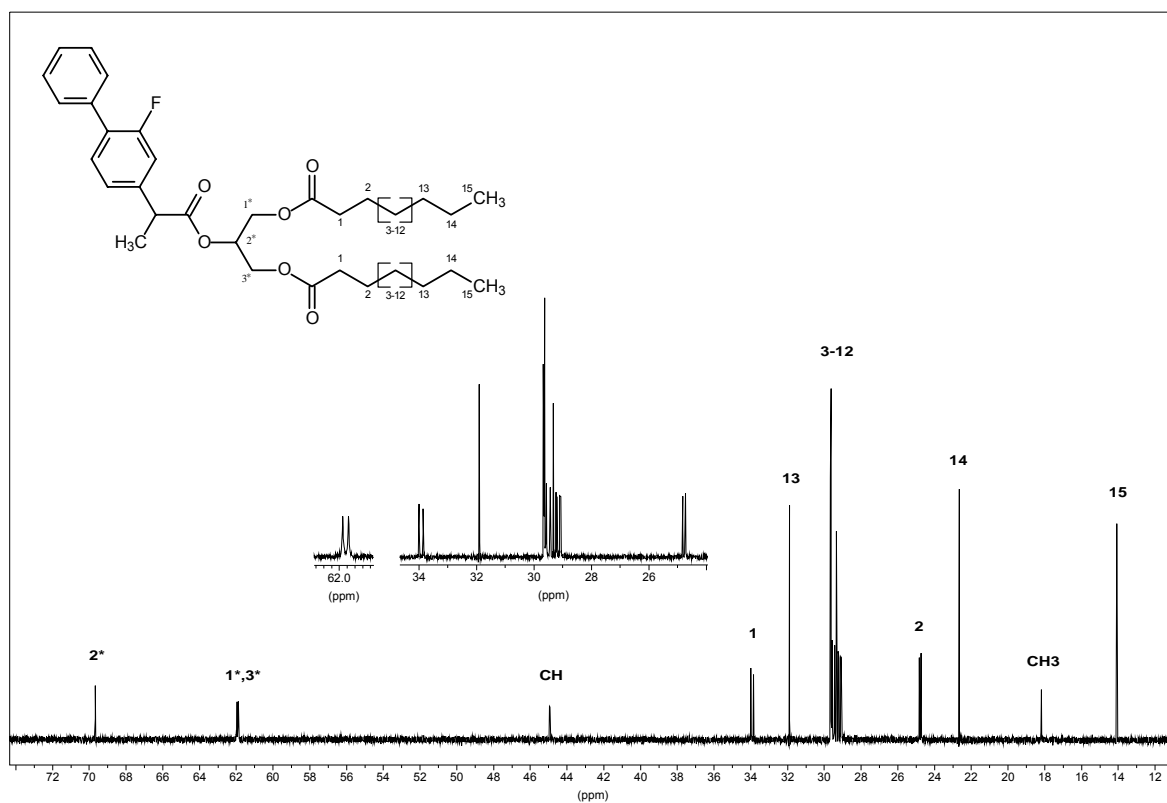
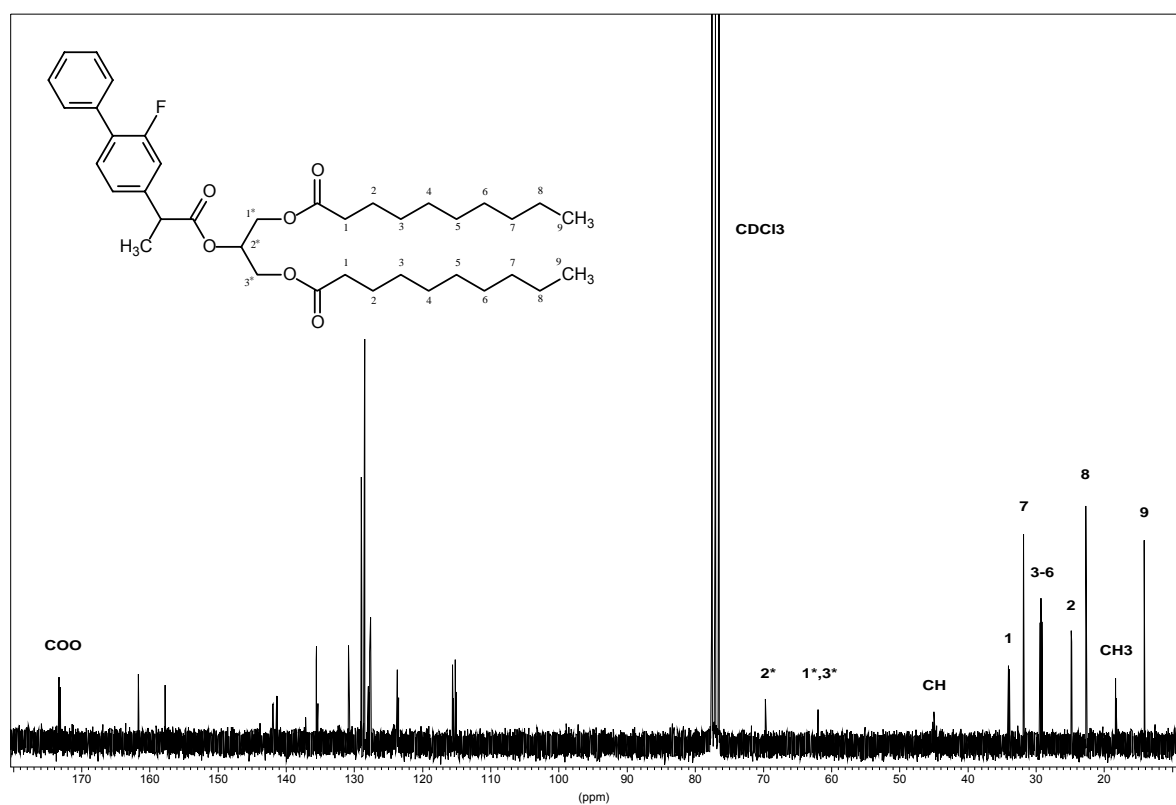
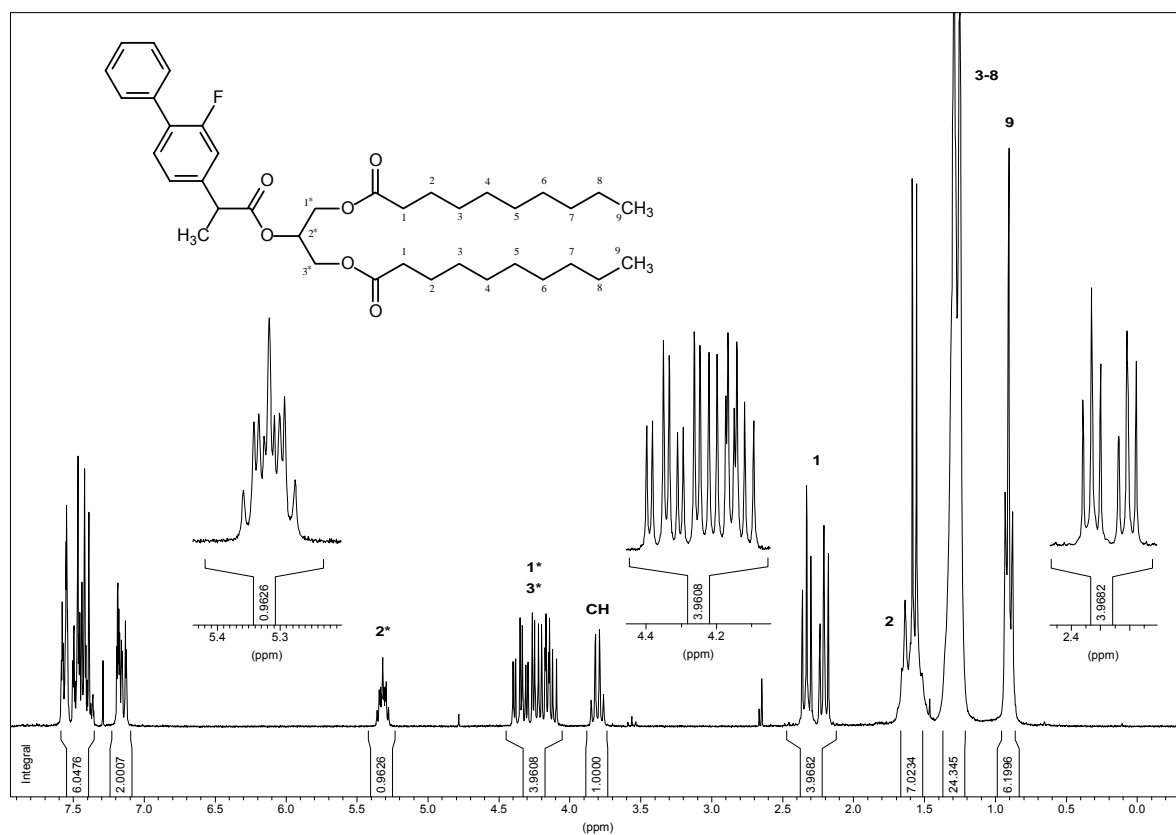


Abb. 2.20: ^{13}C -NMR von 2-[(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyloxy]-3-[(palmitoyloxy)propyl]palmitat (CDCl_3) (**35**), Aliphatenbereich

Die Synthese von **36** erfolgte analog zu Verbindung **35** mit geringfügig veränderten Reaktionsbedingungen wie z.B. Rühren über Nacht. Der Ester konnte in 40%iger Ausbeute als farbloses Öl erhalten werden.



2.1.5 Synthese von Piperazinamid-Derivaten des Flurbiprofens

Die Verbindung **37** konnte problemlos durch Aminolyse des Säurechlorids **27** mit Phenylpiperazin und anschließender Aufreinigung als rosa Feststoff in 86%iger Ausbeute erhalten werden. Eine entsprechende Verbindung ist von Ibuprofen bekannt, jedoch ist keine Synthese in der Literatur beschrieben.

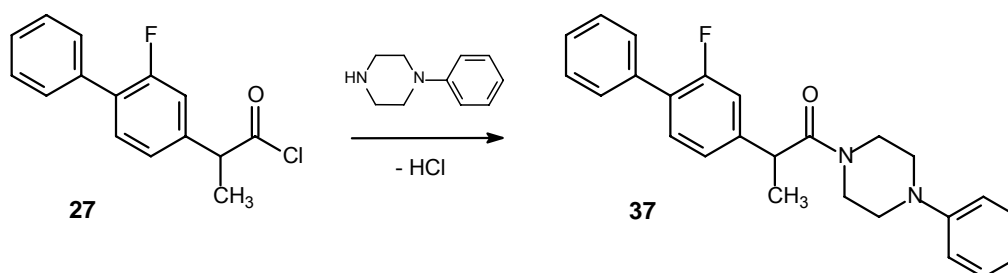


Abb. 2.23: Synthese von **37** durch Aminolyse von **27**

Die Identität und Reinheit der Verbindung konnte mittels GC/MS-Methode A und ^1H - sowie ^{13}C -NMR bestätigt werden. Deutlich ist im Massenspektrum in Abb. 2.24 der Molpeak von $m/z = 388$ zu erkennen.

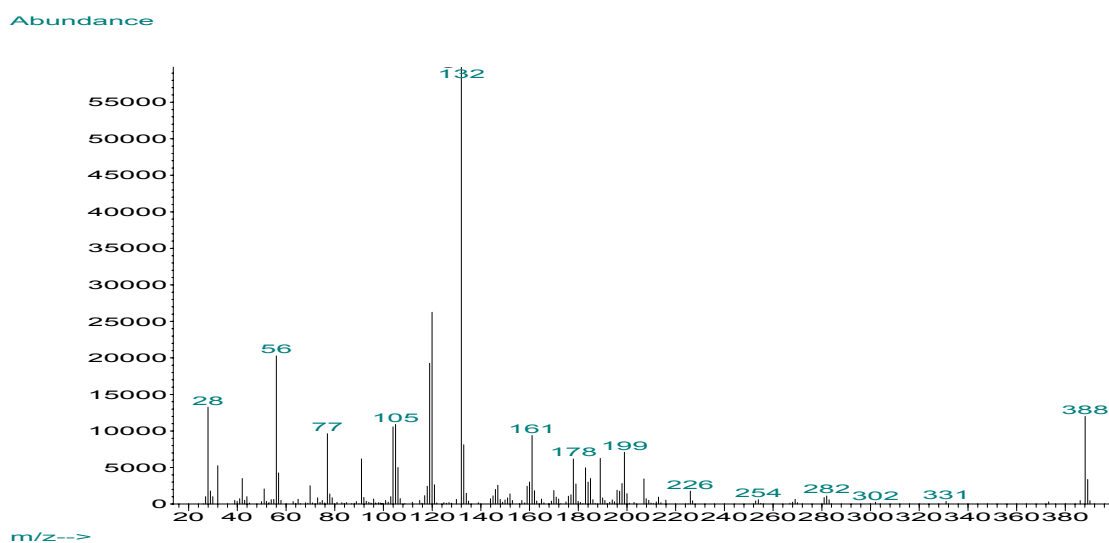


Abb. 2.24: Massenspektrum von **37**

Im ^1H -NMR der Verbindung **37** erscheinen die insgesamt 13 aromatischen Protonen der Phenylringe im Bereich von 6,87 – 7,48 ppm als überlagerte Multipletts.

Ebenfalls überlagerte Multipletts ergeben die Methylenprotonen des Piperazinringes, wobei die Signale der zur Amidbindung benachbart liegenden Protonen aufgrund der stärkeren elektronenziehenden Wirkung dieser Gruppe ins Tieffeld verschoben sind. Das Quartett des Methinprotons erscheint überlagert bei 3,89 ppm, jedoch ist eine vicinale

Kopplungskonstante von $^3J = 6,8$ Hz zur benachbarten Methylgruppe bestimmbar, bei welcher diese Kopplungskonstante ebenfalls gefunden wird. Die Methylprotonen ergeben aufgrund der alleinigen Kopplung mit dem Methinproton ein Dublett bei 1,44 ppm.

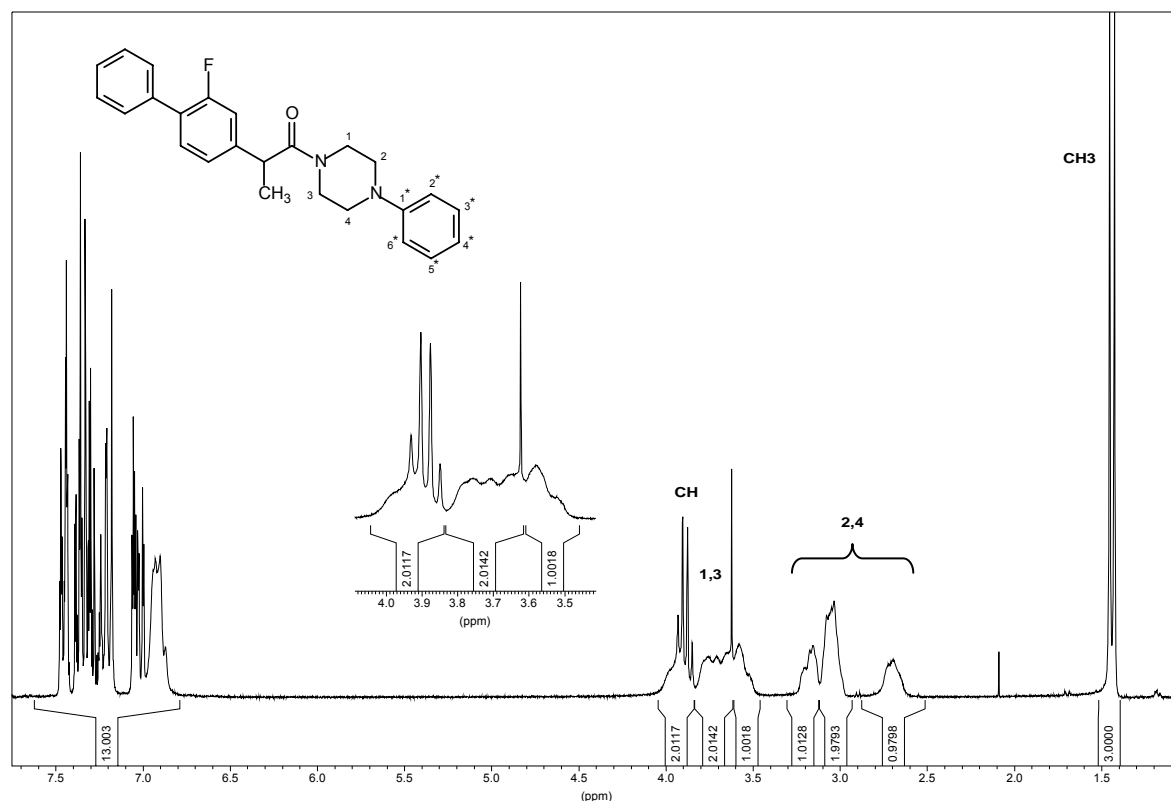


Abb. 2.25: ^1H -NMR von 1-[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]-4-phenylpiperazin (CDCl_3) (**37**)

Das Piperazinamid **38** (s. Abb. 2.26) sollte durch Aminolyse des Säurechlorids von Flurbiprofen (**27**) mit Piperazin erhalten werden. Dementsprechend wurde ein etwa 10-facher Überschuß an Piperazin eingesetzt, zusätzlich noch Dichlormethan als Lösungsmittel verwendet und **27** langsam zur Piperazinslösung hinzuge tropft. Dünnschichtchromatographische Reaktionskontrolle zeigte die vollständige Umsetzung des Säurechlorids nach vier Stunden Rühren bei Raumtemperatur an. Nach Aufarbeitung war jedoch weder in der angesäuerten Wasserphase noch in der organischen Phase eine Substanz der Masse $m/z = 312$ mittels GC/MS-Methode A nachweisbar, die Masse mußte daher höher sein als 425 g/mol – die Nachweisgrenze des Gerätes. ^1H -, ^{13}C -NMR-, DEPT- und HMQC- spektrometrisch konnte die Identität der entstandenen Verbindung jedoch geklärt und dem Diamid **39** zugeordnet werden. Ein hochauflösendes Massenspektrum bestätigte die Zuordnung.

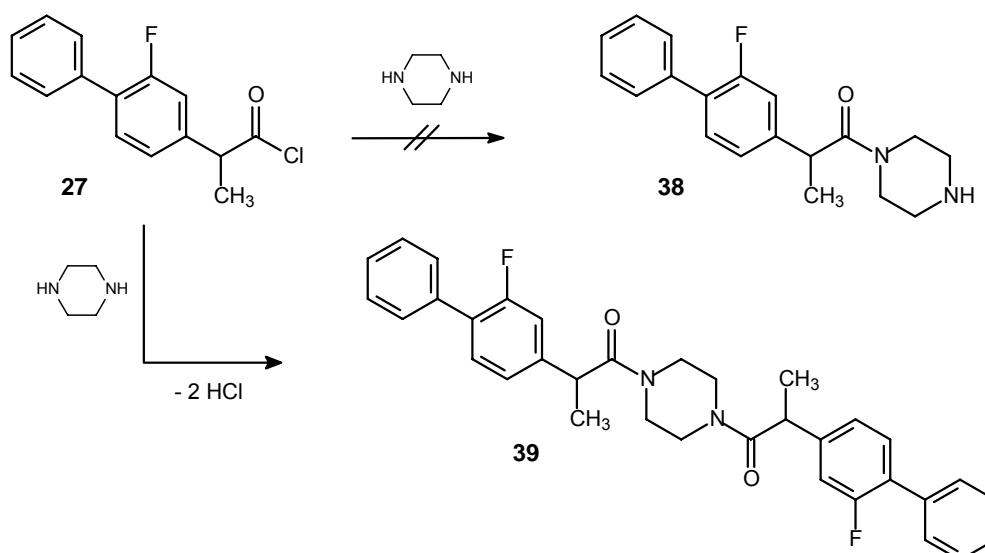


Abb. 2.26: Syntheschema für die Darstellung von **39**

Im $^1\text{H-NMR}$ von **39** können den Signalen der aromatischen Protonen im Bereich von 7,02 – 7,53 ppm anhand der Integration 16 Protonen zugeordnet werden, den aliphatischen von 1,46 - 3,97 ppm ebenfalls 16 Protonen. Aus diesem Verhältnis kann eindeutig auf das Vorliegen eines Diamids geschlossen werden, da sich im Fall des Monoamids ein Verhältnis von aromatischen zu aliphatischen Protonen von 8 zu 12 ergeben hätte.

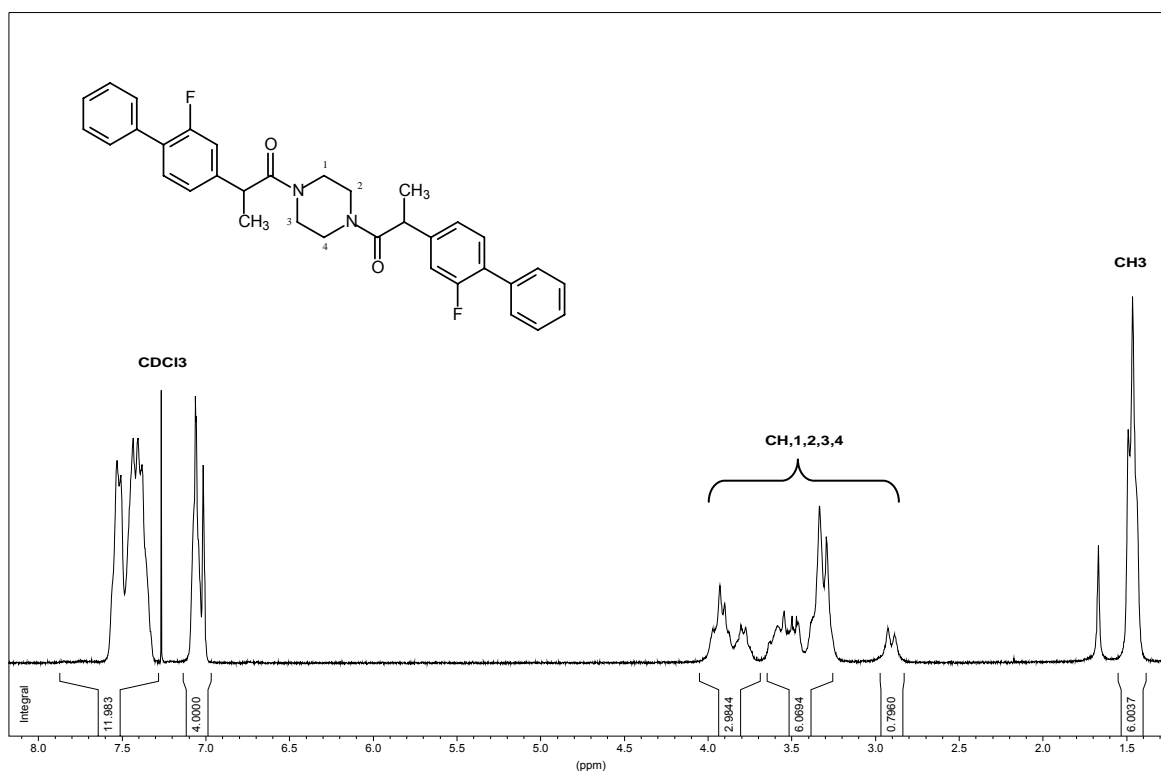


Abb. 2.27: $^1\text{H-NMR}$ von 1,4-Bis[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]piperazin (CDCl_3) (**39**)

Wie schon bei **37** erscheinen die aromatischen bzw. aliphatischen Protonen als überlagerte Multipletts, so daß sich für diese keine Kopplungskonstanten bestimmen lassen. Die Methylprotonen ergeben ein verbreitertes Signal, das bei 1,46 ppm im Hochfeld erscheint.

2.1.6 Synthese von (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)pentan-3-on (**3**)

Eine Synthese dieser Verbindung ist in der Literatur nicht beschrieben.

Die Darstellung des Ethylketons von Flurbiprofen (**3**) gelang im Rahmen dieser Arbeit durch eine Grignardreaktion mit dem Säurechlorid **27** und Diethylcadmium, welches aus Ethylmagnesiumbromid gewonnen werden konnte. Die magnesiumorganische Verbindung konnte nicht direkt eingesetzt werden, da Grignardreaktionen zwischen einem Carbonsäurederivat (Ester, Anhydrid, Halogenid) und Alkylmagnesiumhalogeniden normalerweise zu einem instabilen Halbacetal führen, welches in ein Keton und ein Alkoholatmolekül zerfällt, wobei das Keton anschließend mit weiterem Grignardreagenz zu einem tertiären Alkohol reagiert. Eine Isolierung des Ketons ist daher in der Regel nicht möglich. Cadmiumorganische Verbindungen besitzen dagegen den Vorteil, daß ihre, im Vergleich zu magnesiumorganischen Verbindungen, geringere Reaktivität gerade noch ausreicht um das Säurechlorid anzugreifen, das Keton jedoch nicht, so daß dieses isoliert werden kann. Die Organocadmium-Verbindungen sind durch Reaktion mit Alkylmagnesiumhalogeniden mit wasserfreiem Cadmiumhalogenid in Ether zugänglich.



Abb. 2.28: Darstellung von Diethylcadmium aus Ethylmagnesiumbromid

Das auf diese Weise erhaltene Diethylcadmium konnte anschließend nach Lösungsmittelaustausch gegen Benzol mit dem Säurechlorid **27** umgesetzt werden.

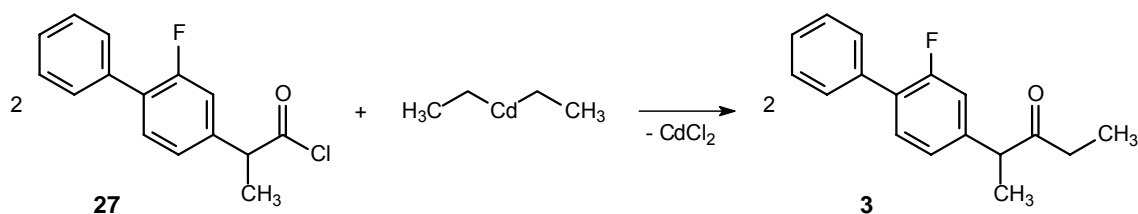


Abb. 2.29: Synthese von **3** durch Umsetzung mit Diethylcadmium

Dabei entstand als Nebenprodukt Flurbiprofenethylester (**23**), welcher mit GC/MS-Methode A identifiziert werden konnte. Eine mögliche Erklärung für die Entstehung könnte in der Durchführung des Lösungsmittelaustauschs liegen. Zunächst wurde dabei nämlich der Hauptteil an Ether am Rotationsverdampfer unter Vakuum entfernt, dann 10 ml Benzol zur Lösung zugegeben und der restliche Ether anschließend abgezogen. Da eine absolute Sauerstoffabwesenheit nicht gewährleistet werden konnte, ist eine Oxidation des Grignardreagenzes durch Luftsauerstoff zu Ethanol nicht auszuschließen, wobei der entstandene Alkohol mit dem Säurechlorid des Flurbiprofens leicht zum Ethylester weiterreagieren kann.

Eine Entfernung des Nebenproduktes gelang nach Verseifung des Ethylesters **23** mit wässriger Kaliumhydroxidlösung in Ethanol unter Rückfluß und nachfolgender Extraktion mit Ether. Reste des entstandenen Flurbiprofens konnten anschließend säulenchromatographisch leicht abgetrennt werden.

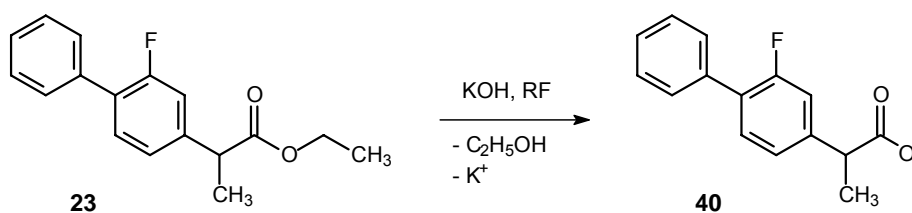


Abb. 2.30: Esterhydrolyse von **23**

Eine GC/MS-Analyse nach Methode A bestätigte die Identität des Ketons **3** mit der Masse von 256 g/mol und zeigte eine Reinheit von 100%. Es gab keine Hinweise mehr auf die Anwesenheit von Flurbiprofen und des Flurbiprofenethylesters.

Abundance

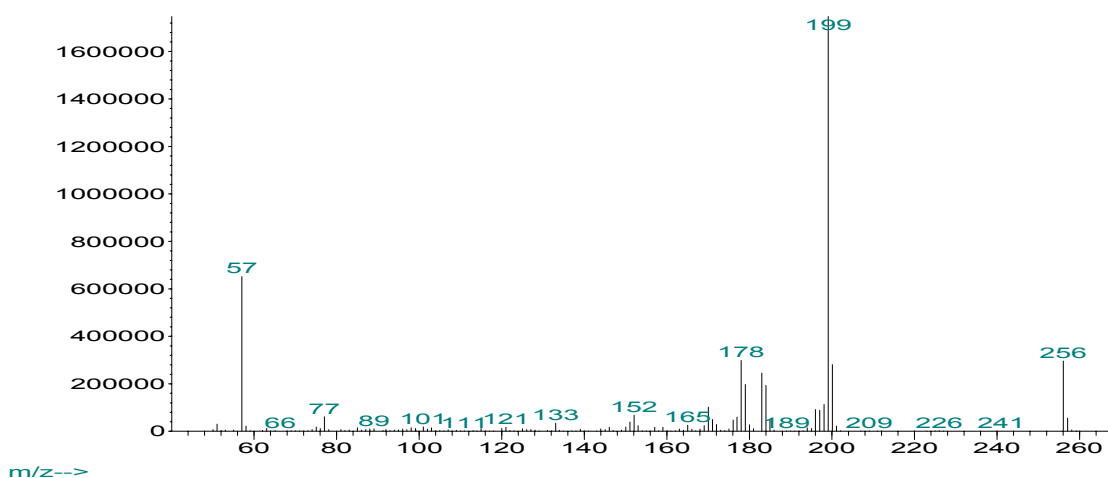


Abb. 2.31: Massenspektrum von **3**

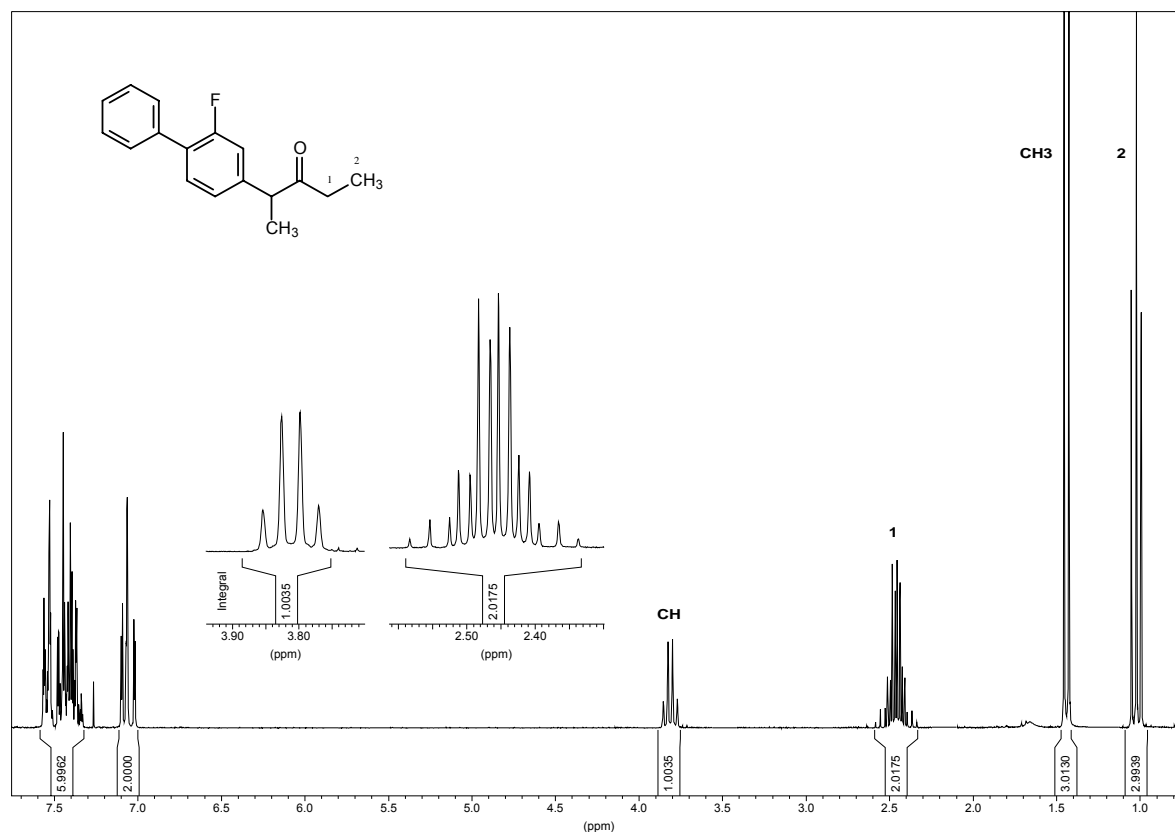


Abb. 2.32: $^1\text{H-NMR}$ von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)pentan-3-on (250 MHz, CDCl_3) (**3**)

Im $^1\text{H-NMR}$ von **3** sind die zwei Signale der Methylgruppen bei 1,04 ppm sowie 1,45 ppm zu erkennen, welche aufgrund der unterschiedlichen Multiplizitäten und Kopplungskonstanten eindeutig zugeordnet werden können. Das Hochfeld-Triplett resultiert aus der Kopplung der Methylprotonen mit den beiden zur Ketogruppe alpha-ständigen Methylenprotonen mit denen sie ein ABX_3 -System bilden (s. Abb. 2.32).

Die Methylenprotonen A und B von (1) sind nicht äquivalent und spalten jeweils in ein Quartett von Triplets von Dubletts vom Dublett auf, wobei die entstehenden Doppelquartetts beider Protonen aufgrund ähnlicher chemischer Verschiebungen ineinander verschoben sind. Das Ausmaß der Überlappung variiert mit der zur Aufnahme der Spektren verwendeten Frequenz (s. Abb. 2.33). Im 400 MHz-Spektrum erhält man ein 16-Linien-Signal, im 250 MHz-Spektrum, bedingt durch Koinzidenz von 2×2 Linien, eine Multiplizität des Signals von 14. Mit Ausnahme der Multiplizität des Signals der Methylenprotonen sind beide Spektren identisch.

Die große geminale Kopplungskonstante der Wasserstoffatome von $^2J = 17,9$ Hz könnte aus einer effizienten Überlappung der C-H-Bindungen mit der benachbarten π -Bindung der Carbonylgruppe resultieren. Die vicinale Kopplungskonstante zu den drei Methylprotonen beträgt $^3J_{\text{AX/BX}} = 7,3$ Hz.

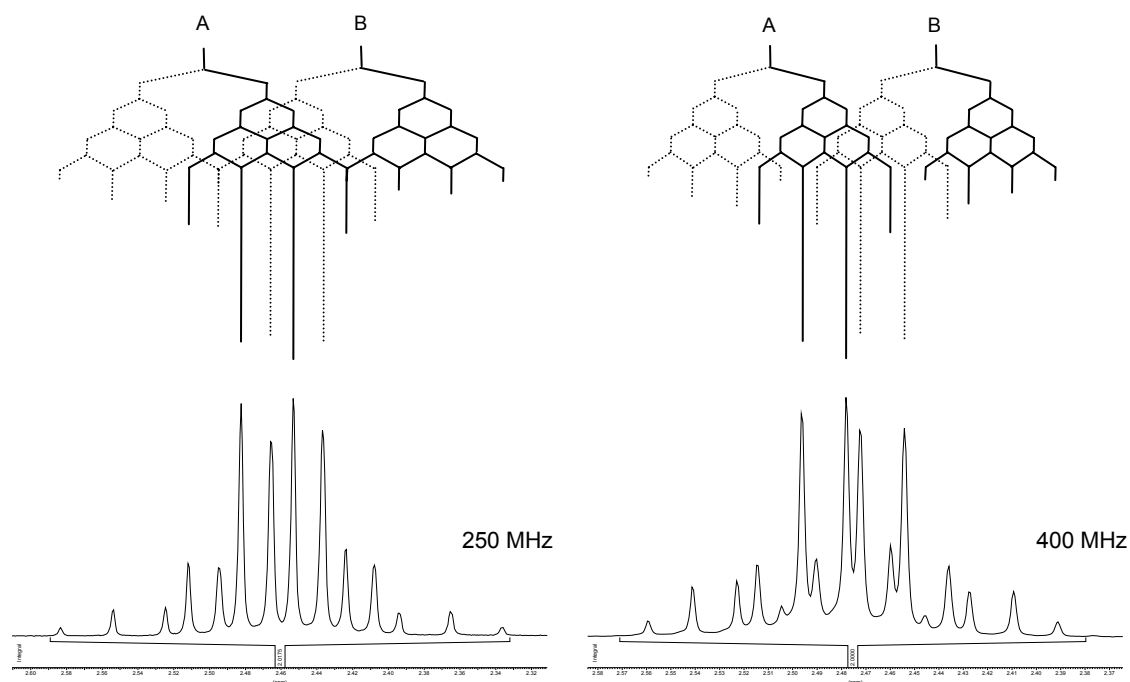


Abb. 2.33: AB-Spinsystem der Methylenprotonen, aufgenommen in CDCl_3 bei 250 und 400 MHz

Da infolge der freien Drehbarkeit der Ethylgruppe um die Einfachbindungen die vicinalen Wasserstoffatome sämtliche dihedralen Winkel durchlaufen können, ermittelt sich dieser Wert für $^3J_{\text{AX/BX}}$ als Durchschnitt verschiedener Kopplungskonstanten, die sich aus den Konformationen mit den größten Aufenthaltswahrscheinlichkeiten ergeben. In der Literatur findet sich für Ethylgruppen ein 3J -Wert von etwa 7 Hz [Friebolin, 1988].

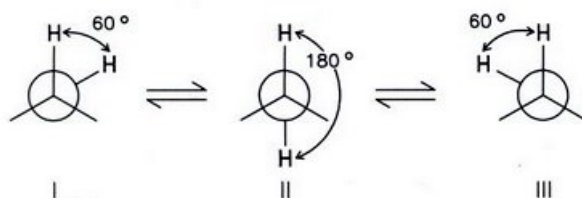


Abb. 2.34: Dihedrales Winkel [Friebolin, 1988]

Die Kopplungskonstante von 7,3 Hz tritt ebenfalls bei dem Triplett der Methylprotonen bei 1,04 ppm in Erscheinung und bestätigt damit die Zusammengehörigkeit der Signale.

Das Dublett, welches bei 1,45 ppm zentriert ist, kann aufgrund der vicinalen Kopplungskonstante von $^3J = 7,1$ Hz der benachbart zur Methingruppe gelegenen Methylgruppe zugeordnet werden, da auch beim Signal des Methinprotons bei 3,83 ppm diese Kopplungskonstante ermittelt wird. Durch die Kopplung der Methylprotonen mit dem Methinproton ergeben sich die gefundenen Multiplizitäten eines Dubletts und eines Quartetts.

Im Folgenden soll das Keton **3** dem Ethylester **23** des Flurbiprofens gegenübergestellt und der Einfluß des im Ersatz der alpha-Methylengruppe durch ein Sauerstoffatom bestehenden Strukturunterschieds diskutiert werden. In Abb. 2.35 wird deutlich, daß die chemischen Verschiebungen der Methingruppe und der benachbarten Methylgruppe nur in geringem Maße durch den Austausch der funktionellen Gruppen verändert werden, da ihre Signale in beiden Spektren nahezu an derselben Stelle erscheinen.

Die Methylengruppe, sowie in geringerem Umfang auch die benachbarte Methylgruppe, wird dagegen stark von der veränderten magnetischen Umgebung der Substituenten beeinflusst. Auffallend ist die starke Hochfeldverschiebung des Signals der Methylenprotonen in **3** im Vergleich zu **23**. Die Ursache könnte in einer größeren Abschirmung der benachbarten Methylengruppe liegen. Da die Ketofunktion einen geringeren elektronenziehenden Effekt ausübt als die Estergruppe, ist die Elektronendichte im Bereich der benachbarten Methylengruppe bei **3** höher und es muß ein stärkeres äußeres Magnetfeld angelegt werden, um diese Kerne in Resonanz zu bringen, was sich wiederum in einem kleinen Wert für die chemische Verschiebung äußert.

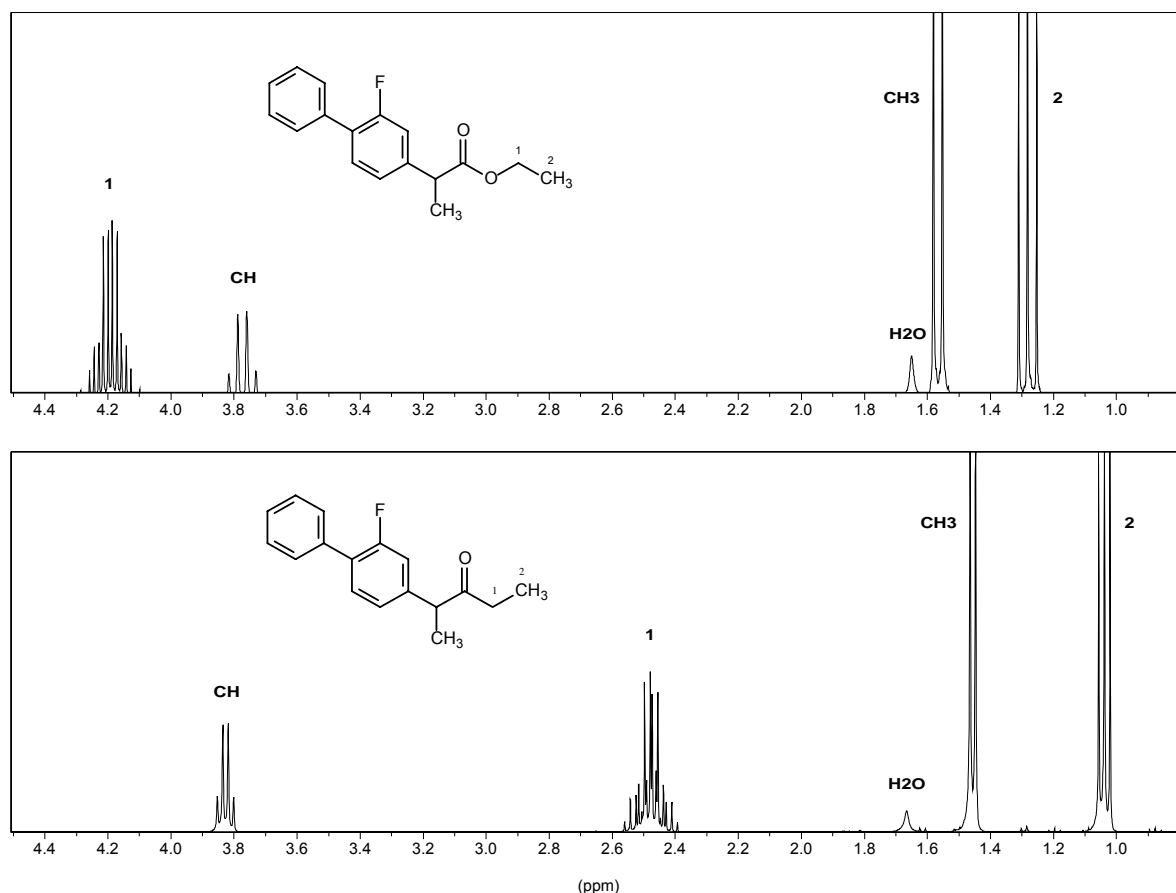


Abb. 2.35: Vergleich des Aliphatenbereichs im ^1H -NMR von Ethylester **23** und Keton **3**

Die magnetische Abschirmung eines Kerns hängt zudem von seiner geometrischen Anordnung zum Restmolekül ab. Die Carbonylgruppe ist magnetisch anisotrop, d.h. daß das von den Elektronen der Bindung induzierte sekundäre Magnetfeld in verschiedenen Richtungen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Je nach Lage der Substituenten resultiert eine stärkere oder schwächere Abschirmung der Kerne. Es ist daher denkbar, daß die Kerne der Methylenprotonen von **3** außerhalb des Abschirmungskegels im Bereich positiver Abschirmung zu liegen kommen und damit hochverschobene Signale resultieren (s. Abb. 2.37). Die Methylenprotonen von **23** erscheinen dazu stark tieffeldverschoben bei 4,13 - 4,26 ppm durch den entschirmenden Effekt der Estergruppe.

Die Nähe des chiralen Zentrums bewirkt eine komplexe Linienaufspaltung der Signale der Methylenprotonen beider Verbindungen.

Anhand der großen Verschiebungsdifferenz der Signale der Methylenprotonen beider Verbindungen von $\Delta\sigma = 1,7$ ppm sowie eines angefertigten Massenspektrums konnte wie bereits beschrieben eine Abtrennung des Nebenproduktes **23** bei der Synthese nachgewiesen werden.

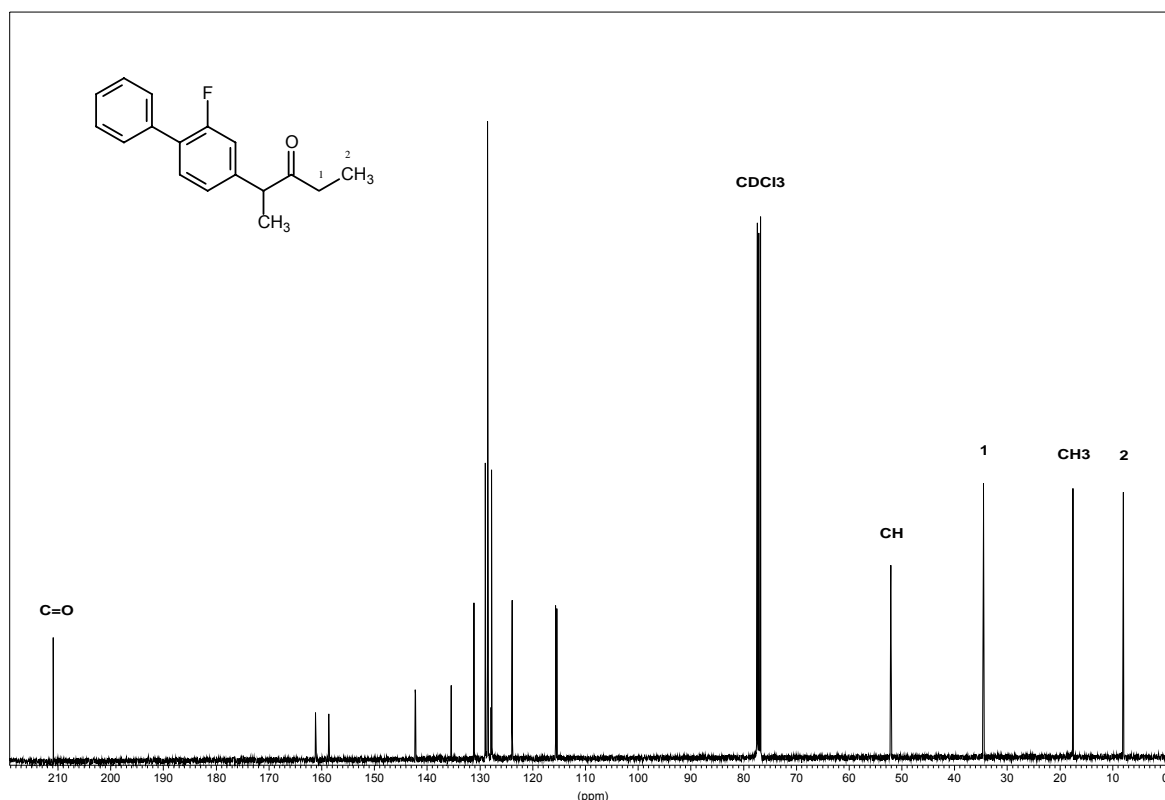


Abb. 2.36: ^{13}C -NMR von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)pentan-3-on (400 MHz, CDCl_3) (**3**)

Im ^{13}C -NMR von **3** ist deutlich das Signal der Ketofunktion bei 210,86 ppm zu erkennen. Es erscheint damit weit tieffeldverschoben im Vergleich zum Esterkohlenstoff von **23** bei 173,97 ppm. Die Ursache könnte wie oben beschrieben die Anisotropie der

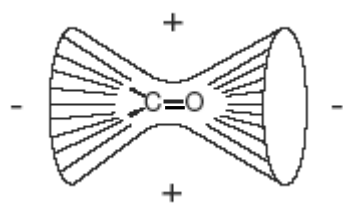


Abb. 2.37: Anisotropie der Carbonylgruppe

Carbonylgruppe sein. Während die Methylenprotonen eventuell nicht mehr im Bereich negativer Abschirmung zu liegen kommen, ist dies beim Kohlenstoff der Fall. Die Folge wäre eine starke Entschirmung und ein σ -Wert weit im Tieffeld. Die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe im Bereich der aromatischen Ringe entsprechen denen des Flurbiprofens.

2.1.7 Synthese von *N*-[(2*S*)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]glycin (**41**)

Für die Darstellung des Flurbiprofenglycinamid **41** finden sich in der Literatur keinerlei Angaben, jedoch ist die Substanz als Metabolit bekannt. Vom Ibuprofen und Ketoprofen sind dagegen Synthesen der Glycinverbindung beschrieben.

Allegretti *et al.* [2005] erhielten das Glycinamid (**G**) wie in Abb. 2.38 dargestellt, durch Umsetzung von Ibuprofen mit dem Hydrochlorid des Glycinmethylesters (**D**) unter Zusatz von Triethylamin als Base. Zur Aktivierung der Carbonsäurefunktion des Ibuprofen wurde *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) zugesetzt, wobei wahrscheinlich ein instabiles O-Acylderivat (**C**) gebildet wird, das nachfolgend mit der Aminkomponente des Glycinmethylesters zum gewünschten Glycinamid (**G**) reagieren kann. Wird jedoch die DCC-Aktivierung wie bei Allegretti *et al.* darüber hinaus noch in Gegenwart von Hydroxylaminderivaten wie 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt) durchgeführt, entsteht zunächst ein Aktivester (**F**), der anschließend in 80%iger Ausbeute zum Säureamid (**G**) weiterreagiert [Fuchs, 2004].

Eine verbesserte Aktivierung der Carbonsäure erreichten Lhiaubet-Vallet *et al.* [2007] bei der Synthese des Glycinamids des Ketoprofen indem sie DCC gegen *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid-hydrochlorid (EDC) austauschten, da das bei der Kupplung entstehende Harnstoffderivat wasserlöslich und ist somit leicht während der wässrigen Aufarbeitung abgetrennt werden kann. Bhuniya *et al.* [Bhuniya, 2006] verwendeten neben EDC noch *N,N*-Dimethyl-4-aminopyridin (DMAP) als nucleophilen Katalysator. Nach der Umsetzung zum Amid kann die Esterspaltung z.B. mit NaOH in Methanol [Bhuniya, 2006] erfolgen.

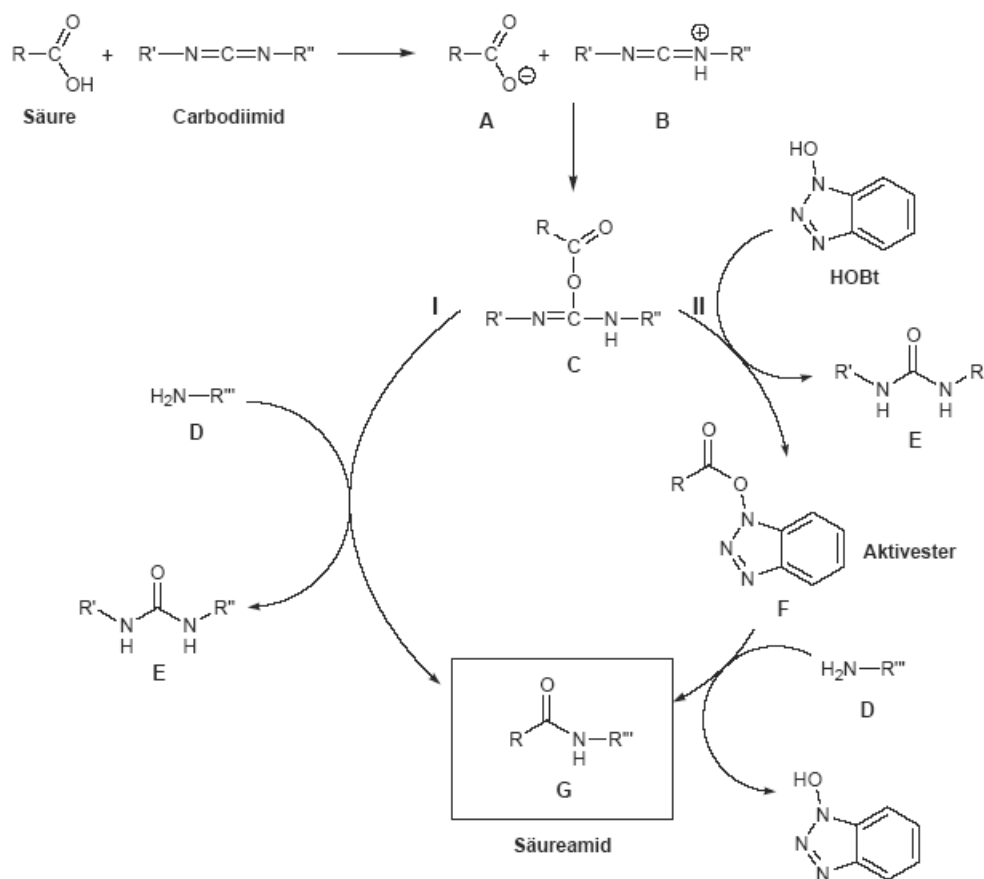


Abb. 2.38: Schematische Darstellung des Mechanismus der Amidbindungsknüpfung mittels Carbodiimid und HOBt (Weg II) bzw. ohne HOBt (Weg I) (Abb. aus [Fuchs, 2004])

Anlehnend an die Synthese von Grill *et al.* [Grill, 1987] für substituierte Benzamidderivate gelang die Darstellung des Glycinamids indem das Säurechlorid des Flurbiprofens (**27**) mit Glycin in wässriger NaOH umgesetzt wurde. Nach anschließender Aufarbeitung wurde **41** als weißer, schimmernder und fluffiger Feststoff in 80%iger Ausbeute erhalten.

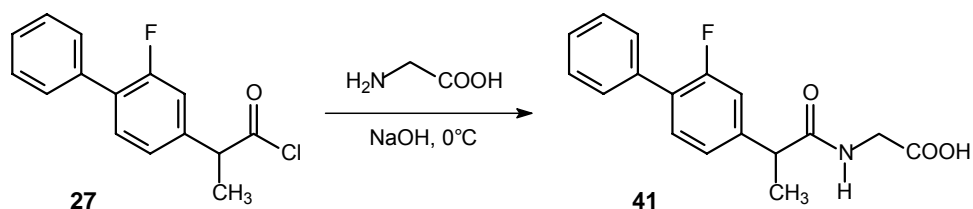


Abb. 2.39: Synthese von **41** nach Grill [1987]

Im ¹H-NMR von **41** kann man neben dem Aromatenbereich und dem Dublett der Methylgruppe bei 1,38 ppm deutlich drei weitere Signale erkennen. Das am weitesten tieffeldverschobene breite Singulett bei 12,57 ppm kann dem Proton der Carboxylgruppe zugeordnet werden. Die Linienverbreiterung ist eine Folge intermolekularer

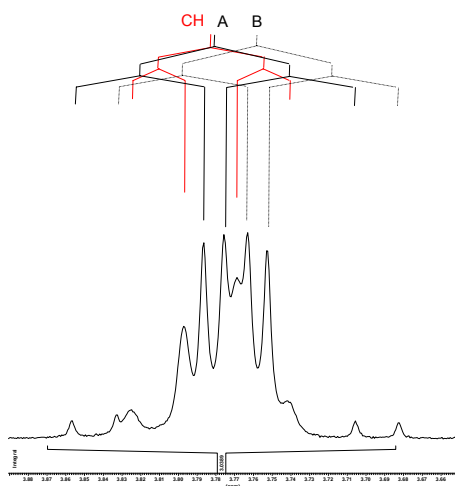


Abb. 2.40: Signal der Methylenprotonen A und B (schwarz) sowie des Methinprotons (rot) im ^1H -NMR von **41** in $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$

Austauschreaktionen der Wasserstoffatome, welche zu gemittelten Signalen führen. Das NH-Proton wird dagegen als Triplett bei 8,41 ppm abgebildet, was zu der Annahme führt, daß in Amiden NH-Protonen nicht so leicht ausgetauscht und damit Kopplungen zu vicinal ständigen Protonen sichtbar werden. Die vicinale Kopplungskonstante von $^3J = 5,8 \text{ Hz}$ bestätigt die Zuordnung des Signals zum Amidproton, da sie auch in den Signalen der dazu benachbarten Methylenprotonen ermittelt werden konnte. Beide Methylenprotonen sind diastereotop und koppeln untereinander und mit dem Amidproton bei nur geringfügig unterschiedlichen σ -Werten im

Bereich von 3,68 – 3,86 ppm, was eine Überlagerung der für jedes Proton entstehenden zwei Dubletts zur Folge hat. Die geminale Kopplungskonstante beträgt $^2J = 17,5 \text{ Hz}$, die vicinalen zum NH-Proton jeweils $^3J = 5,8 \text{ Hz}$. Das Signal wird allerdings vom Quartett des Methinprotons bei 3,78 ppm überlagert (s. Abb. 2.40).

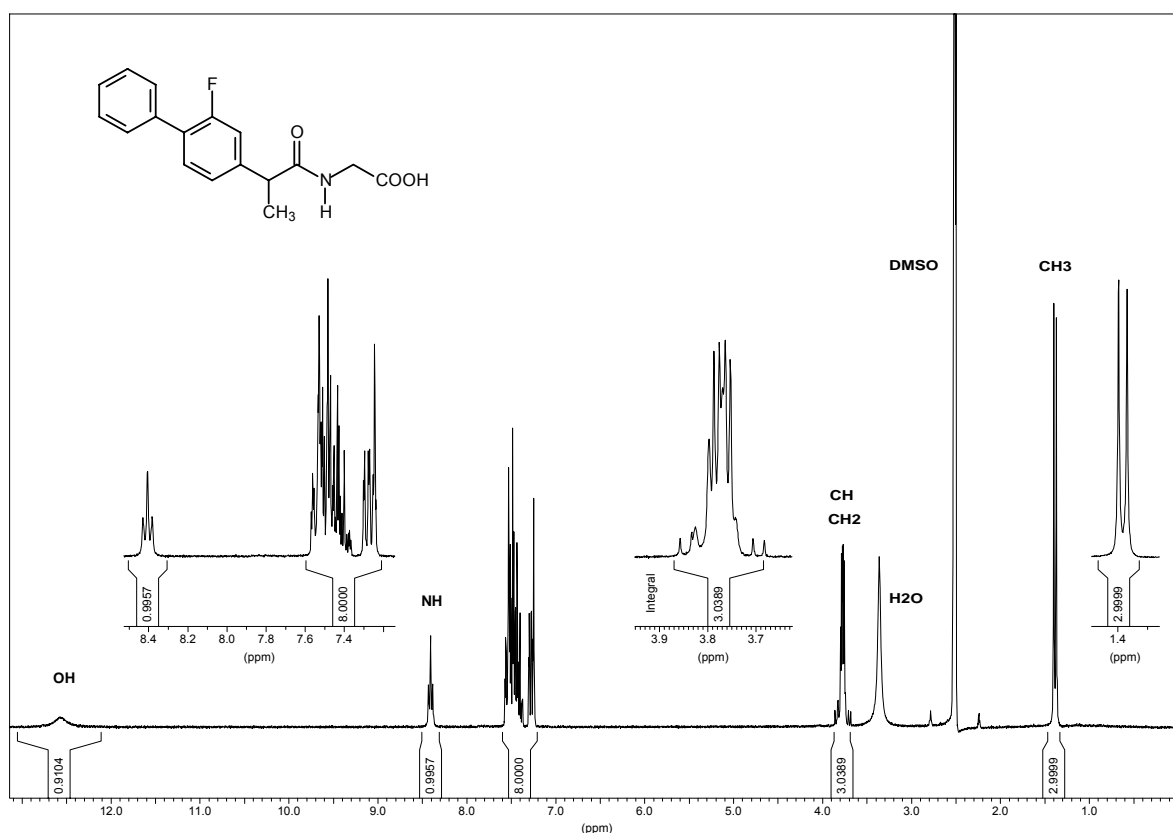


Abb. 2.41: ^1H -NMR von N-[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]glycine ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$) (**41**)

Die Signalaufspaltungen sind jedoch noch erkennbar (s. Abb. 2.40), so daß für das Quartett eine vicinale Kopplungskonstante ermittelt werden konnte ($^3J = 7,1$ Hz). Diese stimmt mit der des Dubletts der Methylprotonen bei 1,38 ppm überein, so daß die Zuordnung bestätigt wurde.

In einem in MeOD aufgenommenen Spektrum sind die Signale des Methinprotons und der Methylenwasserstoffatome nahezu getrennt voneinander als Quartett bzw. Doppeldublett erkennbar, so daß anhand der Integration von 1 bzw. 2 H die Zuordnung der Signale eindeutig vorgenommen werden kann. Allerdings fehlen in diesem Spektrum die Signale der Kopplungen des COOH- und NH-Protons.

Im Unterschied zum Spektrum des Flurbiprofens sind im ^{13}C -NMR von **41** zwei weitere Signale zu erkennen. Das Tieffeldsignal bei 171,58 ppm resultiert aus der Resonanz des Amidkohlenstoffatoms, welcher infolge einer geringfügig schwächeren Entschirmung im Vergleich zum Carboxylkohlenstoff zu diesem leicht hochfeldverschoben erscheint. Die Ursache liegt in der geringeren Elektronegativität des Stickstoffs im Vergleich zum Sauerstoff und der dadurch insgesamt etwas höheren Elektronendichte im Bereich des Kohlenstoffatoms. Weit im Hochfeld ist das zusätzliche Signal der Methylengruppe des Glycins bei 40,55 ppm zu finden.

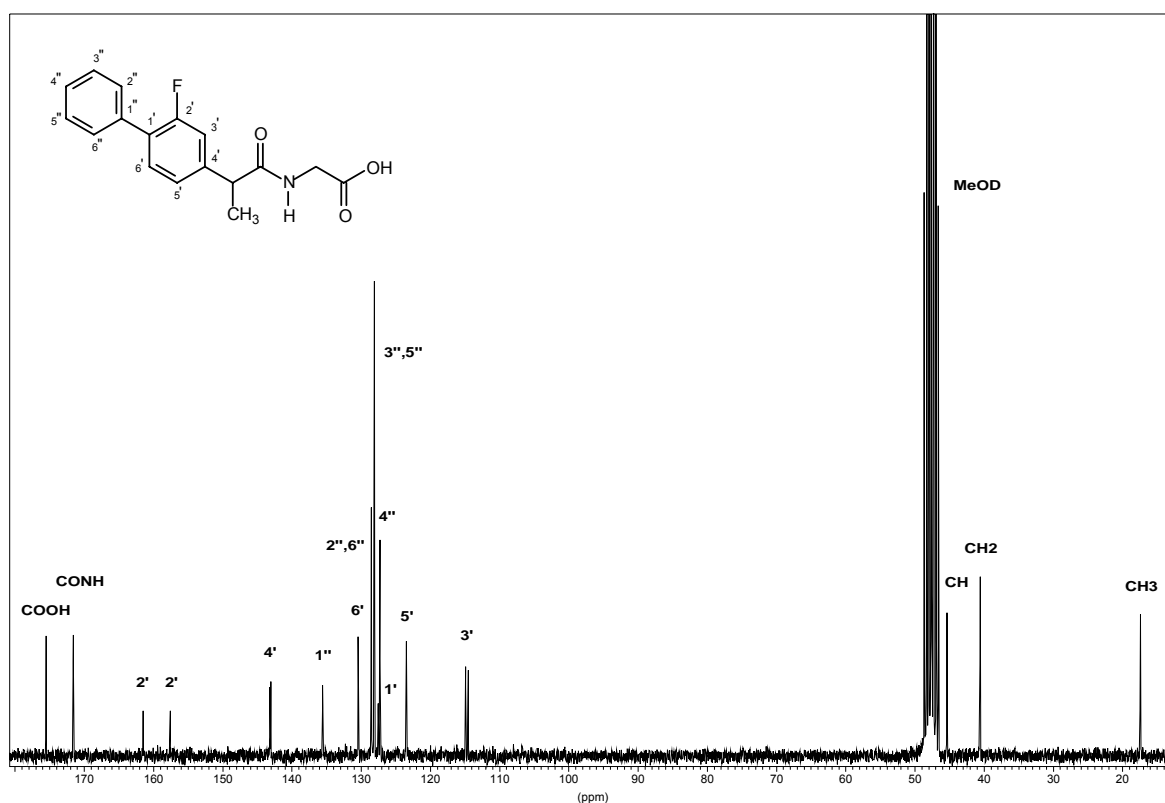


Abb. 2.42: ^{13}C -NMR von N-[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]glycine (MeOD) (**41**)

2.1.8 Synthese von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-(2-hydroxy-ethyl)propanamid; N-(2-chloroethyl)-(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanamid und (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-[(2-morpholin-4-yl)ethyl]propanamid

Die Synthese des Morpholinderivates **44** wurde nach folgendem Syntheschema durchgeführt:

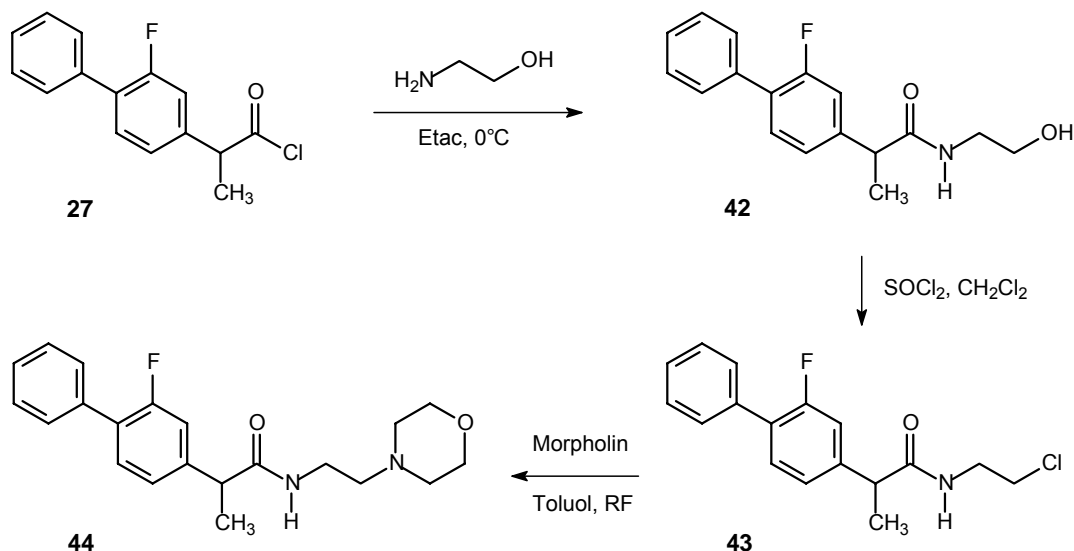
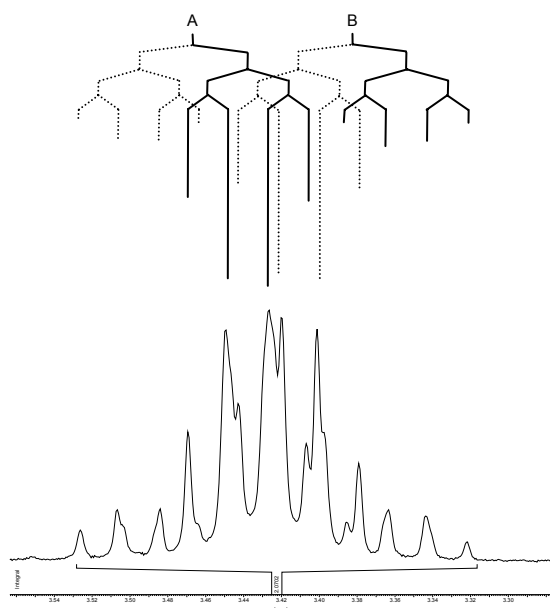


Abb. 2.43: Syntheschema für die Darstellung von **42**, **43** und **44**

Amide zwischen NSAIDs und Ethanolamin sind aus der Literatur z.B. von Ibuprofen und Ketoprofen, nicht jedoch von Flurbiprofen, bekannt. Allegretti *et al.* [2005] und Davaran *et al.* [1997] setzten das Säurechlorid des Ibuprofen mit Ethanolamin in Gegenwart von Triethylamin in 83%iger bzw. 71%iger Ausbeute um. Sie arbeiteten bei unterschiedlichen Temperaturen und mit verschiedenen Lösungsmitteln (Dichlormethan bzw. THF).

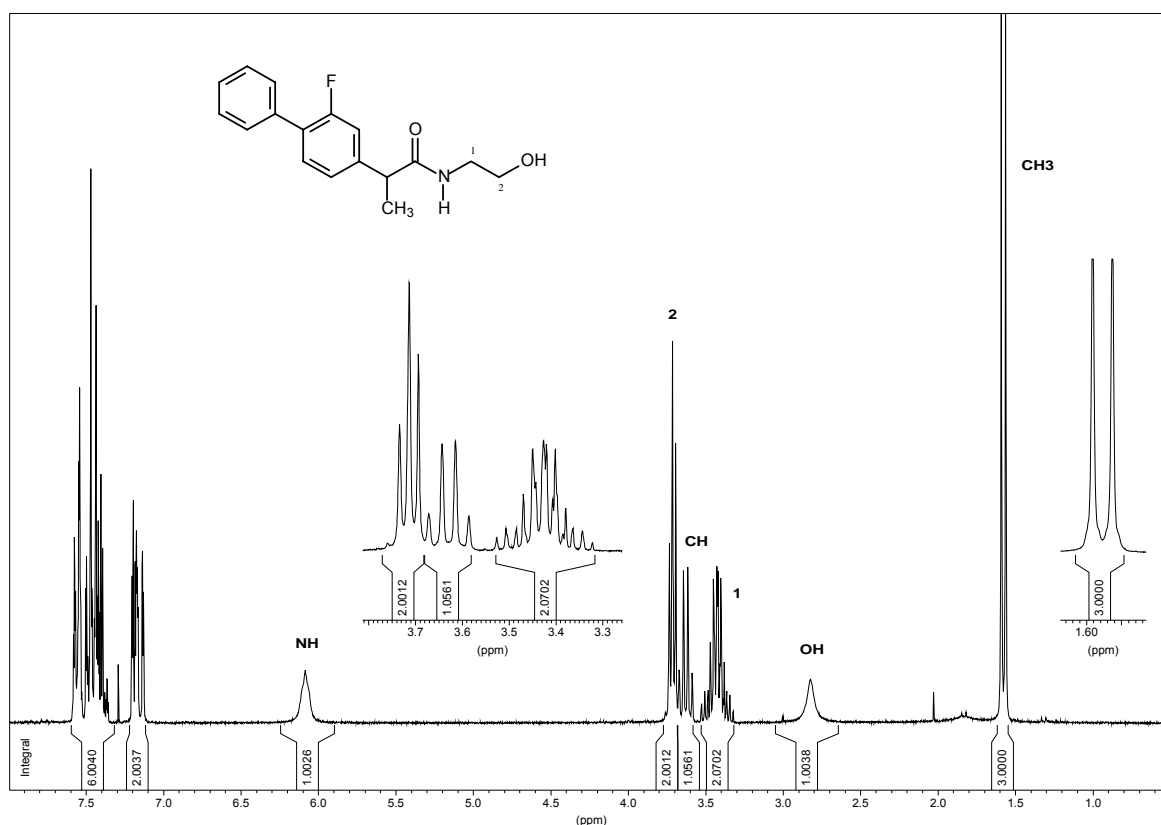
Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Hydroxyethylamid **42** nach Umsetzung von **27** (s. Kap. 2.1.2) mit Ethanolamin in Ethylacetat unter Eiskühlung und nach Aufreinigung als weißer Feststoff in 85%iger Ausbeute erhalten.

Die Identität und Reinheit von **42** konnte sowohl durch NMR als auch GC/MS bestätigt werden. Die Signale der beiden Methylengruppen der Hydroxyethylseitenkette erscheinen bei 3,32 – 3,53 ppm und tieffeldverschoben bei 3,71 ppm. Die benachbart zur Amidgruppe befindlichen Methylenprotonen spalten aufgrund der Nähe zum chiralen Zentrum jeweils in ein Quartett von Dubletts vom Dublett auf (s. Abb. 2.44), wobei die einzelnen Protonen untereinander mit einer geminalen Kopplungskonstante von 14,4 Hz und mit den benachbarten Methylenprotonen sowie dem Amidproton mit unterschiedlichen Kopplungskonstanten von $^3J = 5,0 \text{ Hz}$ und $^3J = 5,5 \text{ Hz}$ koppeln.

Abb. 2.44: Signal der α -Methylenprotonen von **42**

Eine Kopplungskonstante von $^3J = 5,0$ Hz kann auch im Triplett der anderen Methylengruppe bei 3,71 ppm bestimmt werden. Die Signale der OH- und NH-Gruppen erscheinen durch einen eventuell auftretenden intra- und intermolekularen Wasserstoffaustausch als verbreiterte Singulett bei 2,82 ppm und 6,08 ppm.

Der Aromatenbereich, sowie die Methyl- und Methingruppe zeigen im Wesentlichen das gleiche Aufspaltungsmuster wie bei Flurbiprofen.

Abb. 2.45: ^1H -NMR von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-(2-hydroxyethyl)propanamid (CDCl_3) (**42**)

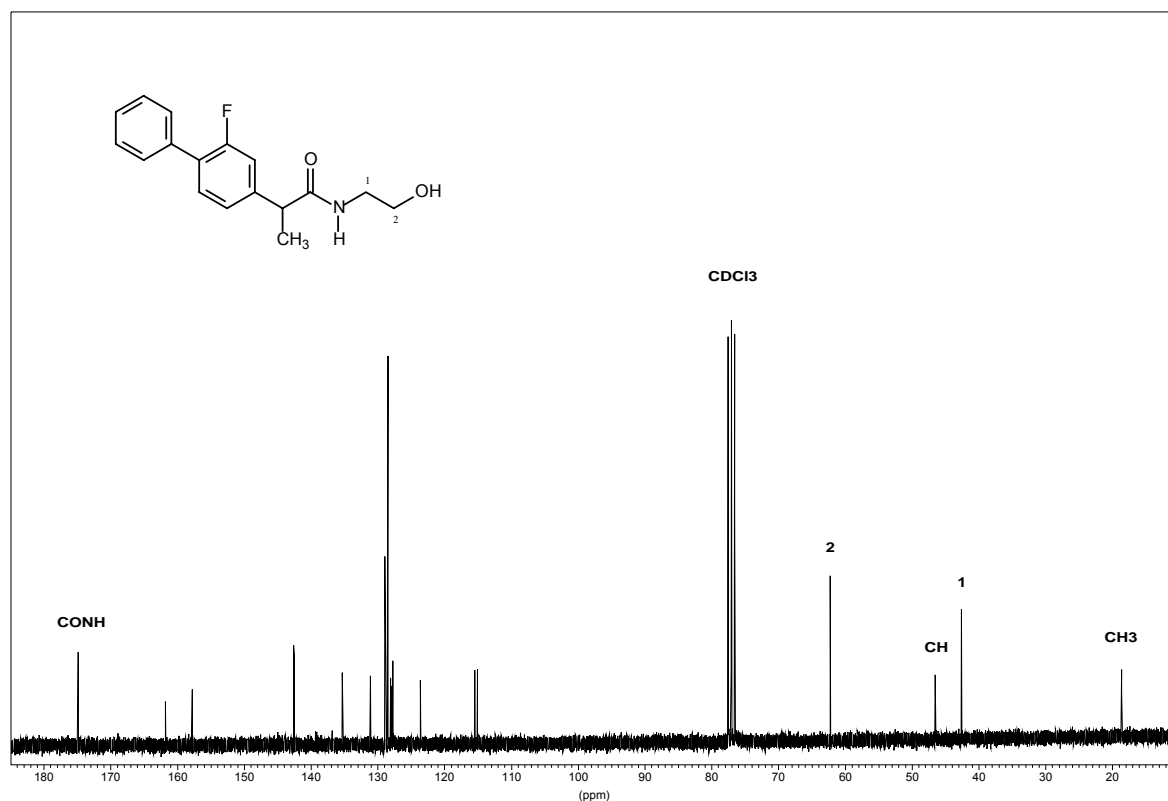


Abb. 2.46: ^{13}C -NMR von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-(2-hydroxyethyl)propanamid (CDCl_3) (**42**)

Das Chlorethylamid **43** wurde durch Erhitzen von **42** in Dichlormethan mit Thionylchlorid bei 40°C quantitativ erhalten. Das nach Abdampfen des Lösungsmittels und überschüssigen Thionylchlorids erhaltene schwach gelb-orange Öl kristallisierte nach einiger Zeit zu einem schwach gelblichen Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung für Folgesynthesen verwendet werden konnte.

Das Signal des NH-Protons erscheint im ^1H -NMR der Verbindung **43** wie bei **42** als verbreitertes Singulett bei 5,96 ppm (s. Abb. 2.47). Infolge der Umsetzung mit Thionylchlorid und Überführung in die Chlorverbindung ist ein der OH-Gruppe von **42** entsprechendes Signal bei 2,82 ppm nicht mehr feststellbar, was eine vollständige Substitution der Hydroxygruppe gegen Chlor beweist. Im Unterschied zur Ausgangsverbindung **42** erhält man für **43** ein insgesamt stark vereinfachtes ^1H -NMR-Spektrum. Die Signale des Methinprotons und der vier Methylenprotonen fallen zu einem Multiplett mit der Integration von 5 H bei 3,55 – 3,69 ppm zusammen, so daß sich keinerlei Kopplungskonstanten bestimmen lassen. Aufgrund des ^{13}C -NMR-Spektrums, eines hochauflösenden Massenspektrums sowie einer Elementaranalyse läßt sich die Verbindung allerdings eindeutig als **43** identifizieren.

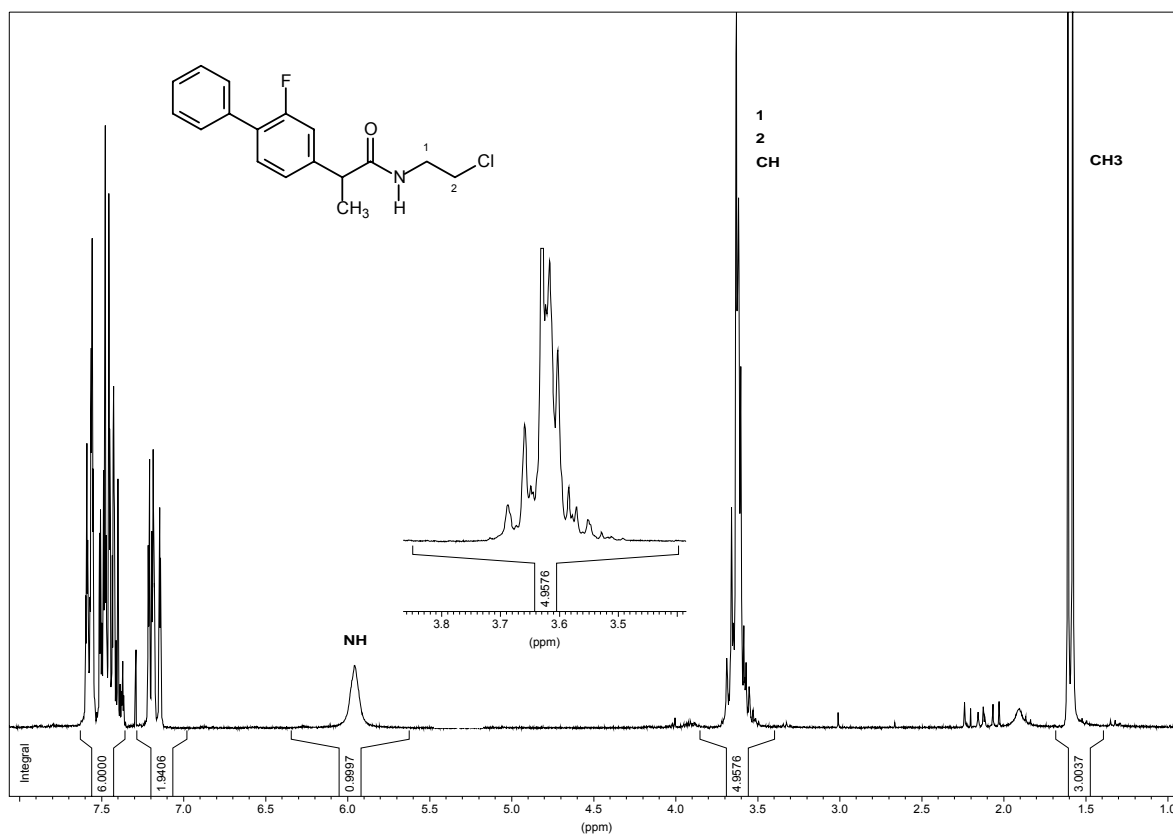


Abb. 2.47: ^1H -NMR von N-(2-chloroethyl)-(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanamid (CDCl_3)(**43**)

Noch deutlicher wird der Effekt der unterschiedlichen Substituenten auf die zur Amidgruppe beta-ständigen Methylenkohlenstoffe anhand des ^{13}C -NMR (s. Abb. 2.48). Der Chlorsubstituent hat im Vergleich zum Sauerstoffatom der Hydroxygruppe eine geringere Elektronegativität, d.h. der elektronenziehende Effekt auf das benachbarte Kohlenstoffatom ist geringer. Die Folge davon ist eine höhere Abschirmung des Kohlenstoffs als bei **42**, was wiederum ein höheres äußeres Feld erfordert um den Kern in Resonanz zu bringen. Daraus ergibt sich ein kleinerer Wert der chemischen Verschiebung von 41,36 ppm für den zum Chloratom benachbarten Kohlenstoff bei **43** im Vergleich zu 62,24 ppm bei **42**.

Die zum Amid alpha-ständige Methylengruppe wird dagegen nur um 1,26 ppm ins Tieffeld verschoben, was daraufhin deutet, daß der Effekt elektronegativer Substituenten mit zunehmendem Abstand geringer wird. Der Methyl- und auch der Methinkohlenstoff werden daher so gut wie nicht beeinflusst und erscheinen bei den denselben chemischen Verschiebungen wie in **42**.

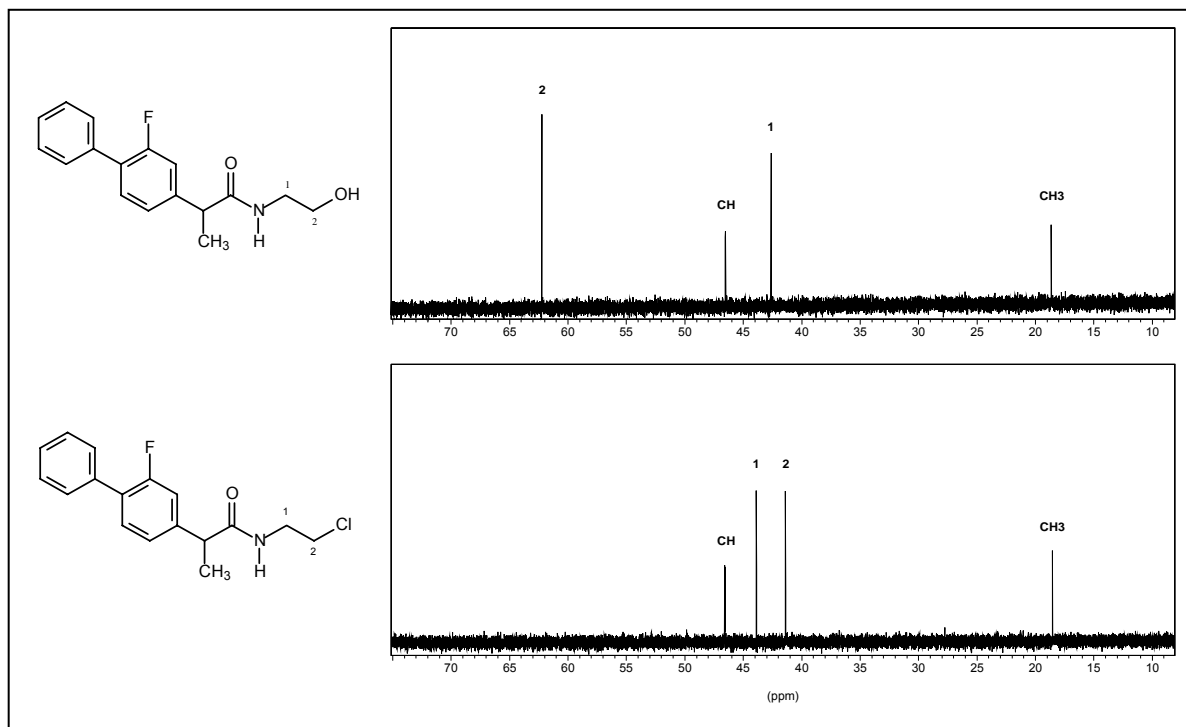


Abb. 2.48: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren des Hydroxyethylamids **42** und des Chlorethylamids **43**

Die GC/MS-Analyse der Zielverbindung konnte zwar aufgrund eines fehlenden Signals bei der Retentionszeit von **42** den Austausch der Hydroxylgruppe gegen ein Halogen bestätigen, jedoch war ein Massenpeak von **43** nicht zu erkennen, da es beim Verdampfen der Probe im GC/MS zu einer Abspaltung des Chlorsubstituenten als HCl kam. Auch bei **45** wurde dieser Effekt, allerdings mit Iod, festgestellt. Der Massenpeak von $m/z = 269$ entspricht dem Fragment der Verbindung nach Abspaltung von HCl.

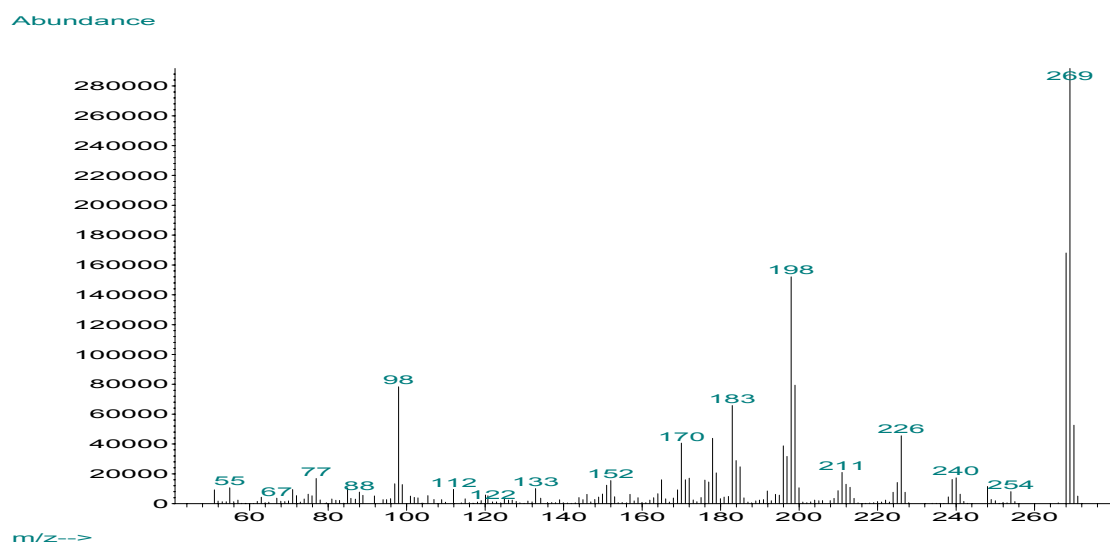
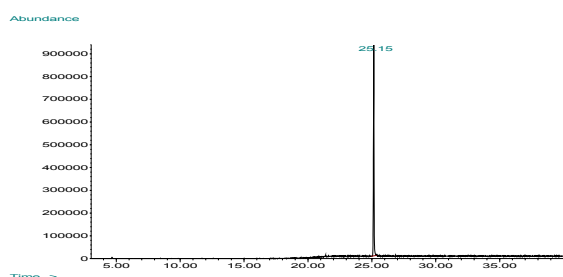


Abb. 2.49: Massenspektrum von **43**

Ein daraufhin angefertigtes hochauflösendes Massenspektrum zeigte den gewünschten Molpeak von $m/z = 306$.

Das Morpholinderivat **44** wurde durch 16-stündiges Erhitzen von **43** mit Morpholin in Toluol gewonnen, wobei bereits nach 10 min in Toluol unlösliches Morpholinhydrochlorid präzipitierte. Nach Abdampfen des Lösungsmittels und des überschüssigen Morpholins war die Aufreinigung des Rückstands aufgrund ungünstiger Phasentrennung und Suspensionsbildung schlecht durchzuführen, so daß Ausbeuten über 19% nicht erreicht werden konnten. Die Identität von **44** konnte sowohl durch NMR als durch GC/MS bestätigt werden.



Ein mit GC/MS-Methode A angefertigtes Massenspektrum zeigt eine Reinheit der Verbindung von 100%.

Abb. 2.50: Gaschromatogramm der Verbindung **44**

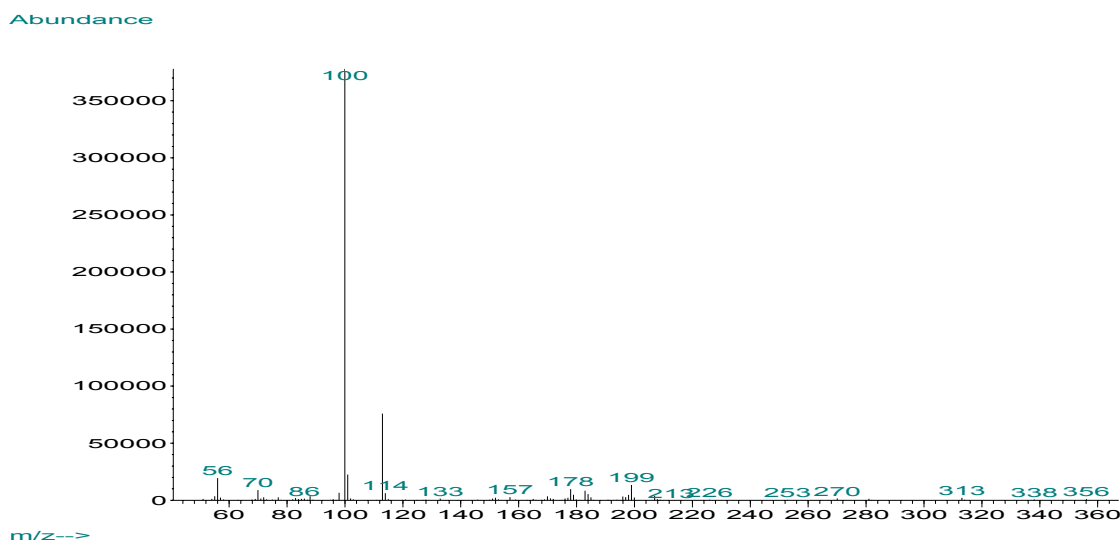


Abb. 2.51: Massenspektrum von **44**

Das ^1H -NMR von **44** zeigt wie im Spektrum von **43** das Signal des Amidprotons bei 6,02 ppm als verbreitertes Singulett und bei 1,57 ppm das Dublett der Methylgruppe. Im Unterschied zu **43** sind die Signale des Methinwasserstoffs und der Methylenprotonen jedoch nicht mehr überlagert. Die Zusammengehörigkeit des Dubletts der Methylprotonen mit dem postulierten Quartett des Methinprotons bei 3,56 – 3,66 ppm kann anhand der vicinalen Kopplungskonstante von 7,1 Hz angenommen werden, allerdings war eine Bestimmung der 3J beim Quartett des Methinprotons nur mit den beiden weiter im Tieffeld

liegenden Linien möglich, da der Rest des Signals vom Signal der zum Sauerstoff des Morpholins benachbarten Methylengruppen überlagert wurde. Diese ergeben infolge der Kopplung mit jeweils zwei benachbarten Methylenprotonen ein Triplet bei 3,58 ppm mit der vicinalen Kopplungskonstante $^3J = 4,7$ Hz. Die gleiche Kopplungskonstante zeigt auch das Triplet bei 2,35 ppm, welches zusätzlich noch anhand der Integration von 4 H den benachbart zum Stickstoff liegenden Methylenprotonen des Morpholins zugeordnet werden konnte. Durch die geringere Elektronegativität des Stickstoffatoms im Vergleich zum Sauerstoffatom werden die Protonen in der Nachbarschaft weniger stark entschirmt, was die Verschiebung der Signale ins Hochfeld zur Folge hat. Die ebenfalls vom Stickstoffatom beeinflussten beta-Methylenprotonen der Ethylkette erscheinen daher bei einer ähnlichen chemischen Verschiebung wie die des Morpholinringes, was eine geringe Überlagerung der Signale verursacht. Die beiden Triplets sind jedoch noch eindeutig zu unterscheiden. Das Signal der beta-Methylenprotonen ist bei 2,42 ppm zentriert und entsteht durch Kopplung mit den zwei anderen Methylenprotonen der Kette erwartungsgemäß als Triplet, wobei die vicinale Kopplungskonstante hier $^3J = 6,0$ Hz beträgt. Die alpha-Methylenprotonen ergeben aufgrund der Kopplung mit insgesamt drei Wasserstoffatomen ein Quartett mit einer vicinalen Kopplungskonstante von $^3J = 6,0$ Hz, welches bei 3,32 ppm zentriert ist.

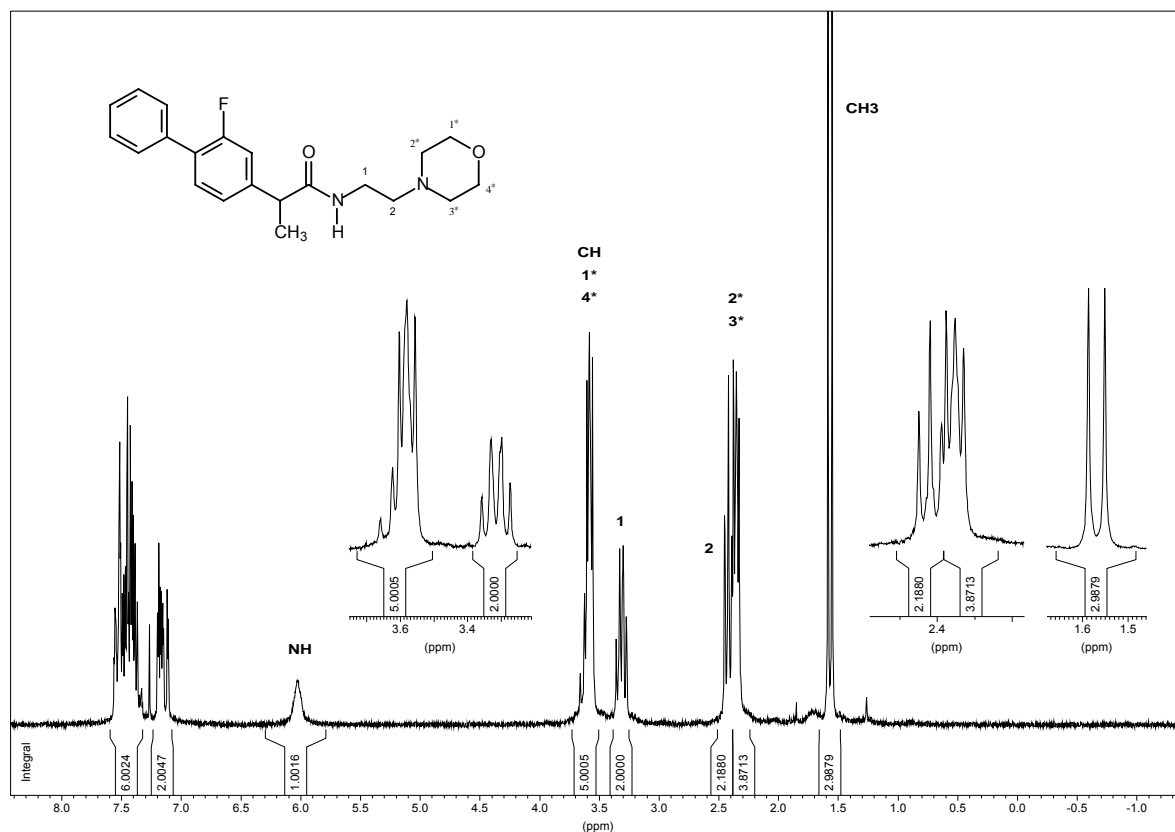


Abb. 2.52: ^1H -NMR von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-[(2-morpholin-4-yl)ethyl]propanamid (CDCl_3) (**44**)

Bei genauerer Betrachtung des Signals fällt auf, daß eine Linienverbreiterung vorliegt, was darauf hindeutet, daß beide Protonen nicht in gleicher Weise mit den benachbarten Wasserstoffatomen koppeln. Aufgrund des stärkeren elektronegativen und damit entschirmenden Einflusses der Amidgruppe im Vergleich zum Morpholinstickstoff erscheint das Signal der alpha-Methylenprotonen tieffeldverschoben zu den beta-ständigen. Eine Bestimmung der Kopplungskonstante beim NH-Signal ist aufgrund der starken Linienverbreiterung nicht möglich.

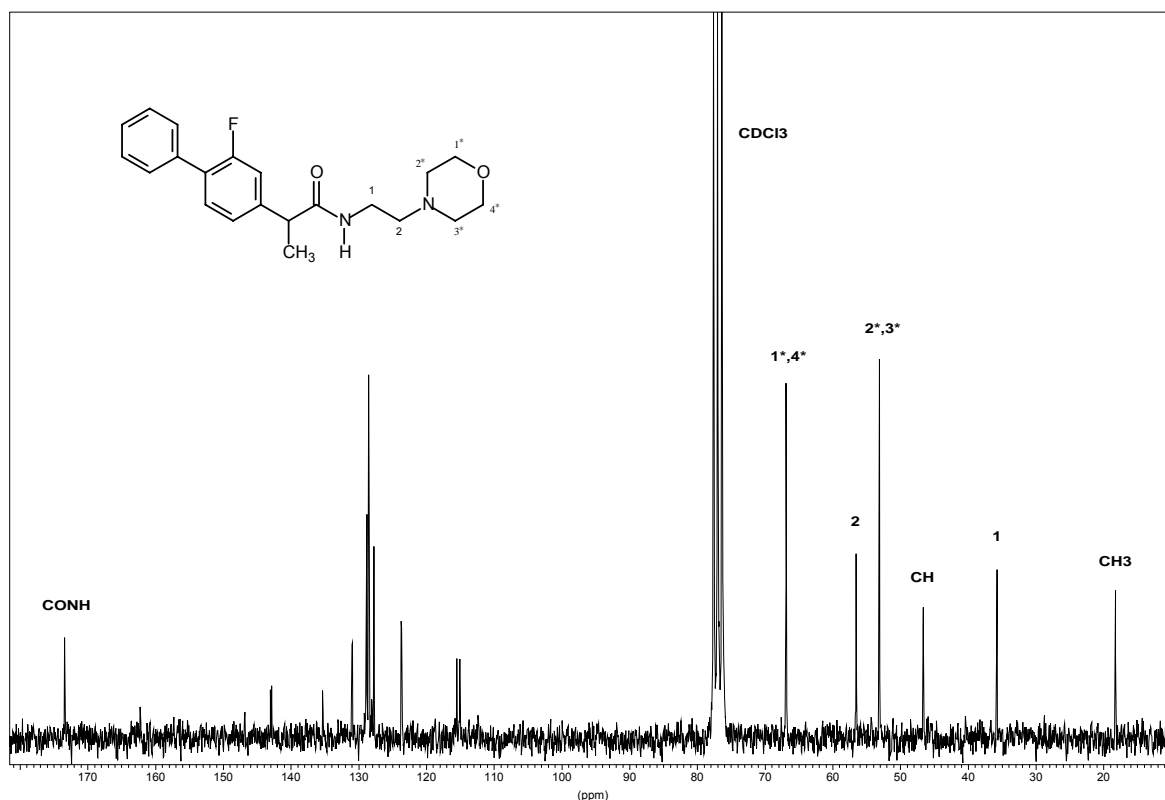


Abb. 2.53: ^{13}C -NMR von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-[(2-morpholin-4-yl)ethyl]propanamid (CDCl_3) (44)

Im ^{13}C -NMR der Verbindung sind deutlich die zwei Signale der Morpholin-Kohlenstoffatome bei 53,13 ppm und 66,89 ppm zu erkennen (s. Abb. 2.53). Die Tieffeldverschiebung des Signals der benachbart zum Sauerstoff des Morpholinringes liegenden Kohlenstoffatome resultiert wie schon im ^1H -NMR aus der größeren Elektronegativität des Sauerstoff- im Vergleich zum Stickstoffatom.

2.1.9 Synthese von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-(2-iodethyl)-propanamid (**45**)

Aufgrund der geringen Ausbeute bei der Synthese des Morpholinderivates **44** aus dem Chlorethylamid des Flurbiprofens (**43**) war eine Erhöhung der Reaktionsfähigkeit des Eduktes Ziel der im Folgenden beschriebenen Synthese. Zur Darstellung des Iodethylamids **45** wurde **43** in einer Finkelstein-Reaktion mit einem Überschuß Natriumiodid in wasserfreiem Aceton umgesetzt.

Bei der Finkelstein-Reaktion handelt es sich um eine nucleophile Halogenid-austauschreaktion vom S_N2-Typ zur Synthese von Iodiden und Fluoriden aus Bromiden und Chloriden unter Verwendung von Metallhalogeniden (KI, NaI) in Aceton. Die Triebkraft dieser Reaktion liegt zum Teil in der Löslichkeit begründet: NaCl und NaBr sind in Aceton schlecht löslich und präzipitieren, während z.B. Natriumiodid in Lösung verbleibt. Dadurch wird das Gleichgewicht der Reaktion irreversibel zu den Produkten hin verschoben.

Nach einer zweitägigen Reaktionszeit unter Rückflußbedingungen und einer säulenchromatographischen Aufreinigung konnte **45** in 31%iger Ausbeute erhalten werden. Infolge der geringen Ausbeute wurde auf eine weitere Umsetzung zu **44** verzichtet.

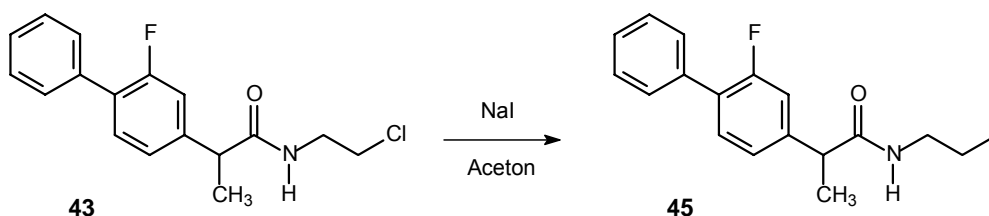


Abb. 2.54: Synthese von **45** nach Finkelstein mit NaI in trockenem Aceton

Anhand des ¹³C-NMR von **45** wird der Austausch des Chlorsubstituenten gegen Iod besonders an der nachbarständigen Methylengruppe deutlich. Erschien der Kohlenstoff in **43** noch bei 41,36 ppm, so wird das Signal in **45** stark hochfeldverschoben dazu bei 5,41 ppm gefunden. Die große Verschiebungsdifferenz resultiert aus einer Besonderheit des Iodatoms. Bei Fluor-, Chlor- und Bromsubstituenten findet man eine zunehmende Tieffeld-Verschiebung des benachbarten Kohlenstoffs mit steigender Elektronegativität, das Iod fällt jedoch durch seinen Schweratomeffekt aus dem Rahmen. Hier beeinflusst offenbar die große Zahl von Elektronen des Iodatoms die diamagnetische Abschirmung des direkt gebundenen Kohlenstoffatoms, was zu der starken Hochfeldverschiebung des Signals führt [Friebolin, 1988].

Ein angefertigtes DEPT-Spektrum bestätigte die Identität einer Methylengruppe bei 5,41 ppm. Eine Simulation des Spektrums mit ACD ChemsSketch ergab eine vergleichbare chemische Verschiebung des entsprechenden Methylenkohlenstoffs (6,36 ppm).

Die Signale der anderen Kohlenstoffatome des Aliphatenbereiches werden durch den Substituentenaustausch kaum beeinflusst und erscheinen bei vergleichbaren chemischen Verschiebungen im Spektrum.

Ein ungenügender Trocknungsvorgang nach der Reinigung des Probenröhrchens führte zu den Signalen von Ethanol im ^1H -NMR von **45**.

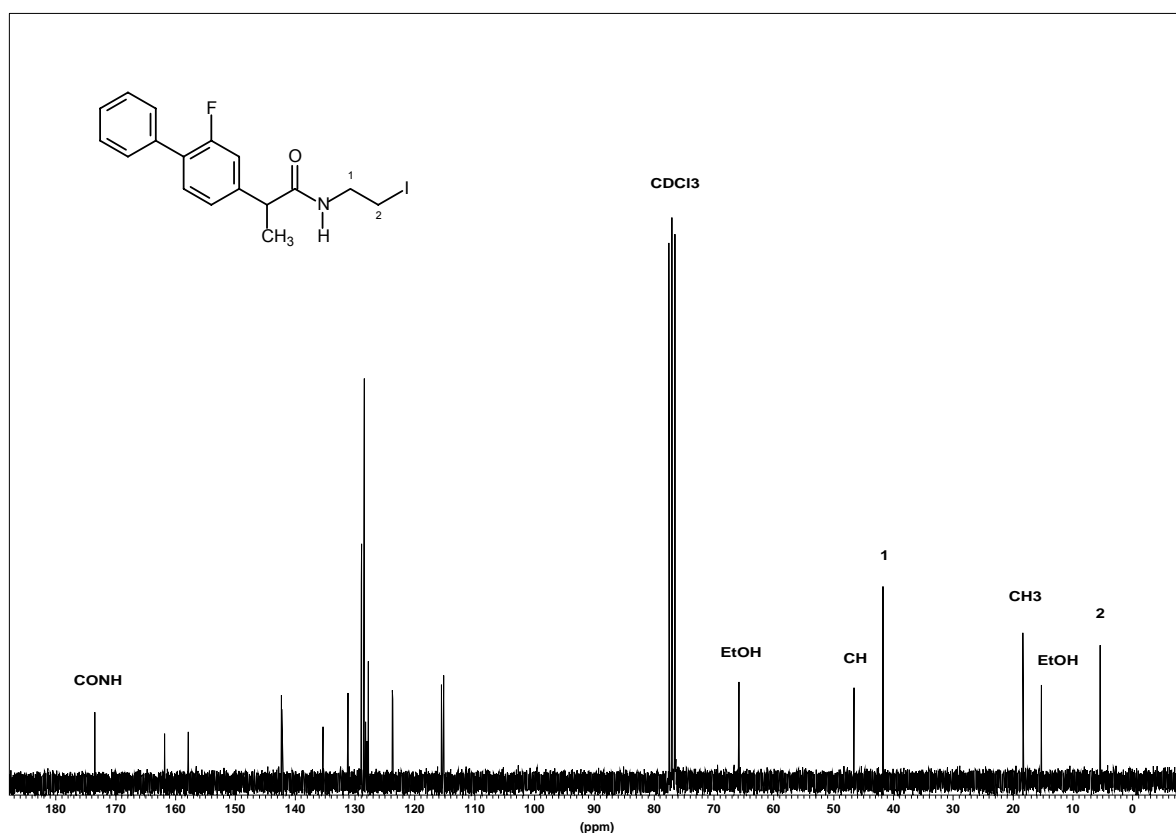


Abb. 2.55: ^{13}C -NMR von (2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-(2-iodoethyl)propanamid (CDCl_3) (**45**)

2.2 Synthese der aktiven Metaboliten von PETN und GTN

In den folgenden Kapiteln soll auf die Synthese der aktiven Metaboliten des Pentaerythritoltetranitrat (PETN) und Glyceroltrinitrat (GTN) eingegangen werden. Unter „aktiven Metaboliten“ seien in diesem Zusammenhang die Nitrat-haltigen Verbindungen Pentaerythritoltrinitrat (PETriN), Pentaerythritoldinitrat (PEDiN), Pentaerythritolmononitrat (PEMN), sowie Glycerol-1,3-dinitrat (1,3-GDN), Glycerol-1,2-dinitrat (1,2-GDN), Glycerol-1-mononitrat (1-GMN) und Glycerol-2-mononitrat (2-GMN) verstanden (s. Abb. 2.56).

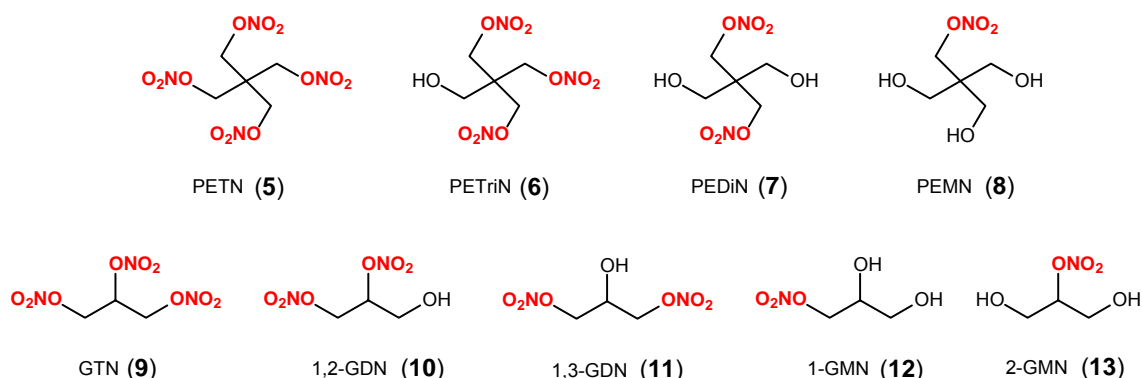


Abb. 2.56: Aktive Metaboliten des PETN und GTN

2.2.1 Allgemeine Prinzipien bei der Herstellung von organischen Nitraten

In der Literatur sind mehrere Möglichkeiten zur Synthese organischer Nitraten beschrieben [Boschan, 1955; Berthmann, 1963], wovon einige zusammenfassend in Abb. 2.57 dargestellt sind. Für einzelne Substanzen bzw. Substanzgruppen werden spezifische Reaktionen in den jeweiligen Kapiteln näher erläutert.

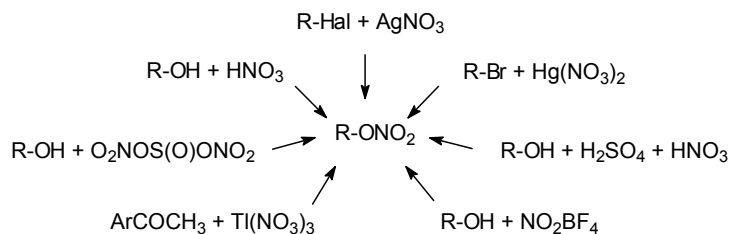


Abb. 2.57: Literaturbekannte Synthesen für organische Nitraten

Nachfolgend sollen die gängigsten Synthesewege kurz beschrieben werden.

Die bekannteste Methode ist die Veresterung eines Alkohols mit Salpetersäure. Zur vereinfachend als Nitrierung bezeichneten Reaktion kann z.B. ein Gemisch aus konz. Schwefelsäure und konz. Salpetersäure im Verhältnis 1:1, ein Gemisch aus konz. Salpetersäure und Essigsäureanhydrid oder reine konz. Salpetersäure mit oder ohne Lösungsmittel verwendet werden. Der große Nachteil dieser Methode ist das Auftreten partiell nitrierter Produkte bei der Herstellung von Salpetersäureestern mehrwertiger Alkohole.

Viele Synthesevorschriften sehen einen Zusatz von Harnstoff vor um die bei der Nitrierung entstehende salpetrige Säure zu zerstören [Boschan, 1955], wobei daraus Kohlendioxid, Stickstoff und Wasser entstehen. Um Nebenreaktionen wie die Oxidation des Alkohols zu verhindern wird die Synthese normalerweise in der Kälte unter langsamer Zugabe (Rühren) des Alkohols durchgeführt. Da bei der Nitrierung von Pentaerythritol und Glycerol überwiegend die hochbrisanten Sprengstoffe PETN und GTN entstehen können, ist bei diesem Verfahren große Vorsicht geboten. PETN und GTN sind gegen Temperaturerhöhung, Stoß und Reibung empfindlich [Berthmann, 1963] und können plötzlich detonieren.

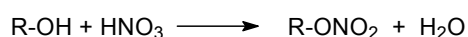


Abb. 2.58: Synthese organischer Nitrate durch Veresterung eines Alkohols mit Salpetersäure

Eine weitere Möglichkeit der Herstellung von organischen Nitraten ist die Umsetzung von Alkylhalogeniden mit Silbernitrat in heterogener oder homogener Phase (s. Abb. 2.59). Vorteilhaft bei diesem Verfahren ist das verminderte Auftreten von Nebenreaktionen, da z.B. Oxidationen durch Salpetersäure oder deren Anlagerung an Doppelbindungen nicht erfolgen können. Bevorzugt werden Bromide oder Iodide als Alkylhalogenide eingesetzt, da die entsprechenden Chloride häufig eine zu geringe Reaktivität aufweisen [Boschan, 1955].

Früher arbeitete man bevorzugt in heterogener Phase indem das gepulverte Silbernitrat mit einer Lösung des Alkylhalogenids in einem inerten Lösungsmittel wie Benzen, Ether oder Nitromethan bei Raumtemperatur gerührt wurde. In seltenen Fällen kann die Silbernitrat-Metathese auch in Abwesenheit eines Lösungsmittels durchgeführt werden [Baker, 1952].

Aufgrund der guten Löslichkeit von Silbernitrat in Acetonitril wird heute meist in homogener Phase gearbeitet. Auf diese Weise wird oft eine höhere Reinheit erzielt [Berthmann, 1963]. Das entstehende Silberhalogenid ist in Acetonitril unlöslich und kann leicht abgetrennt werden. Durch Abfiltrieren und Wiegen des ausgefallenen Silberhalogenids ist es möglich, den Reaktionsverlauf zu verfolgen.

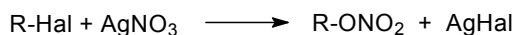


Abb. 2.59: Synthese organischer Nitrate durch Umsetzung von Alkylhalogeniden mit Silbernitrat

Neben Silbernitrat können auch Quecksilber (I)- und (II)-nitrat zur Umsetzung mit Alkylhalogeniden verwendet werden. Ein gängiges Lösungsmittel ist hier z.B. 1,2-Dimethoxyethan [McKillop, 1974].

Alternativ kann, wie bereits von Boschan [1959] beschrieben, ein Alkohol mit Phosgen in das entsprechende Chloroformat **46** umgesetzt werden, das mit Silbernitrat in einem inerten Lösungsmittel zum Nitrat **47** reagiert. Auch hier kann in heterogener (Ether, Benzen oder Tetrachlormethan) oder in homogener Phase (Acetonitril) gearbeitet werden. Die Methode eignet sich besonders zur Synthese von Nitraten, bei denen der ursprüngliche Alkohol säurelabil oder oxidationsempfindlich ist oder bei denen eine bestimmte Stereochemie aufrechterhalten werden soll. Auf diese Weise wurden z.B. Cholesteryl-, Amyl- und Cetyl nitrate hergestellt.

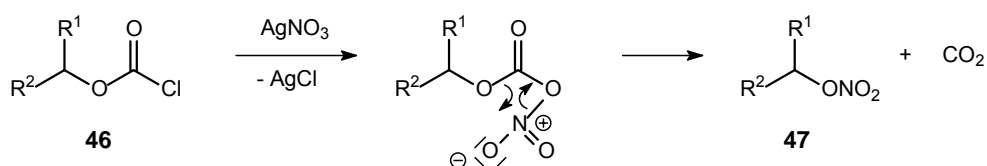


Abb. 2.60: Synthese organischer Nitrate durch Umsetzung von Alkylchloroformaten mit Silbernitrat

Hakimelahi *et al.* [1984] beschreiben eine milde und effektive Methode zur Nitrierung von Glycerol zu GTN, 1,3-GDN und 1-GMN, die sich durch schonende Bedingungen (z.B. Raumtemperatur), kurze Reaktionszeiten und hohe Selektivität auszeichnet. Als Nitrierungsreagenz dient hier ein Gemisch aus Thionylchlorid und Silbernitrat in trockenem THF, welches je nach eingesetztem Mengenverhältnis *in situ* Thionylchloridnitrat $\text{S(O)Cl(ONO}_2\text{)}$ (molares Verhältnis 1:1) oder Thionylnitrat $\text{S(O)(ONO}_2\text{)}_2$ (molares Verhältnis 1:2) bildet (s. Abb. 2.61).

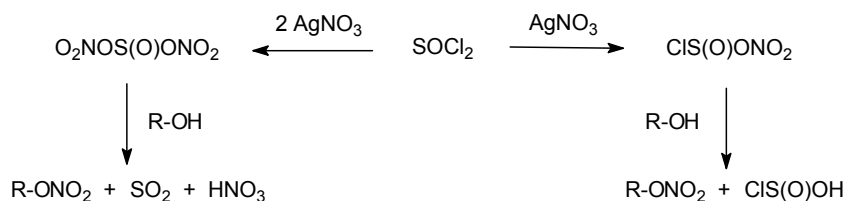


Abb. 2.61: Synthese organischer Nitrate nach Hakimelahi *et al.* [1984]

Neben den Glycerolnitraten werden so z.B. auch Nitratderivate von Kohlenhydraten und Ribonucleosiden selektiv zugänglich. Die Vermutung liegt nahe, daß auch andere Polyalkohole wie Pentaerythritol selektiv verestert werden können, jedoch war eine erfolgreiche Darstellung von PEDiN auf diesem Wege nicht möglich (s. Kap. 2.2.4).

Oláh *et al.* [1956] gelang die Synthese von Alkylnitraten durch Umsetzung von Alkoholen mit Nitryltetrafluoroborat $\text{NO}_2^+\text{BF}_4^-$ (hergestellt aus Distickstoffpentoxid, Fluorwasserstoff und Bortrifluorid [Berthmann, 1963]) im wasserfreien Milieu (s. Abb. 2.62).

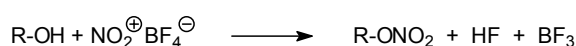


Abb. 2.62: Synthese organischer Nitrate mit Nitryltetrafluoroborat nach Oláh *et al.* [1956]

Die Umsetzung enolisierbarer Ketone (**48**) mit Thallium(III)-nitrat in Acetonitril bei 60-80°C führt ausschließlich zu α -Nitratoketonen (**49**) [McKillop, 1978].

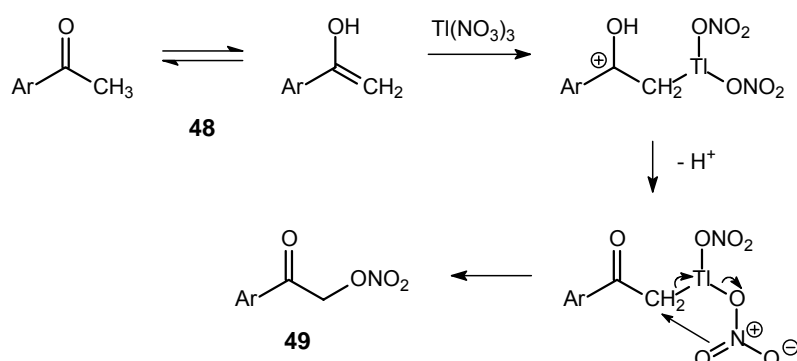


Abb. 2.63: Synthese organischer Nitrate durch Umsetzung enolisierbarer Ketone mit Thallium(III)-nitrat

Für die Tri-, Di- und Mononitrate des Pentaerythritol ist desweiteren auch die Herstellung über eine schrittweise elektrochemische Reduktion von PETN mit einer Quecksilbertropfenelektrode beschrieben [Hess, 2000]. Whitnack *et al.* [1954] führten solche Versuche mit GTN und PETN durch. Dabei wird jede Nitratgruppe in einem 2-Elektronenschritt zum entsprechenden Alkohol und Nitrit reduziert.

Glycerolmono- und dinitrate lassen sich auch in akzeptablen Ausbeuten durch Fermentation aus GTN gewinnen [Ducrocq, 1989 a,b, 1990]. Zur Herstellung von 1-(Nitrooxy)methyl-1,2-ethandiol (1-GMN) ist z.B. die Verwendung von Pilzen wie *Cunninghamella elegans*, *Geotrichum candidum* oder *Beauveria tenella* bzw. *bassiana*, Protozoen wie *Tetrahymena thermophila* oder Hefen wie *Rhodotulura glutinis* und

Hansenula anomala beschrieben, die sich jedoch in ihrer Selektivität erheblich unterscheiden [Wimmer, 1991]. Häufig entstehen Gemische z.B. mit 2-GMN, 1,2-GDN oder 1,3-GDN, die eine weitere Aufreinigung notwendig machen. Diese Möglichkeit der Synthese ist auch für PETN-Metaboliten denkbar. Die mikrobielle Herstellung war jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht Gegenstand der Betrachtungen.

2.2.2 Synthese von Pentaerythritoltetranitrat (PETN) (5)

PETN (5) wurde nach Berthmann *et al.* [1963] durch Nitrierung von Pentaerythritol 50 (PE) mit Nitriersäure gewonnen, wobei PE zunächst unter Rühren bei -5 bis -10°C in konz. Salpetersäure gelöst und das Gemisch anschließend tropfenweise mit konz. Schwefelsäure versetzt wurde. Auch reine rauchende Salpetersäure könnte nach Berthmann *et al.* [1963] zur Nitrierung herangezogen werden.

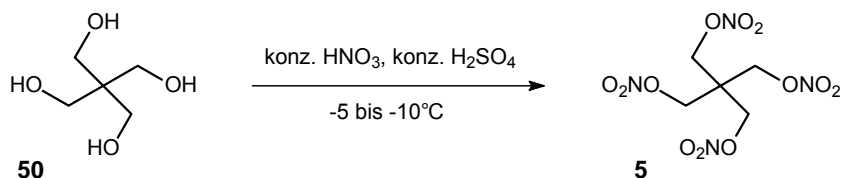


Abb. 2.64: Synthese von PETN (5) durch Nitrierung von Pentaerythritol (50)

Eine genaue Beobachtung der Temperatur während der Nitrierung ist unerlässlich, da PETN nicht nur durch Reibung, sondern auch bei plötzlicher, starker Temperaturerhöhung explodieren kann. Wie bei Berthmann *et al.* [1963] berichtet, schied sich gegen Ende der Veresterung das schwerlösliche Nitrat ab. Abweichend von Berthmann wurde das Reaktionsgemisch nicht nur eine Stunde, sondern 3 Stunden der Nachnitrierung überlassen, anschließend wenig Wasser hinzugefügt und weitere 3 Stunden stehengelassen. PETN ist in Wasser fast unlöslich und fällt daher bei Wasserzusatz aus. Der abfiltrierte und mit Wasser gewaschene Feststoff kann jedoch noch immer Einschlüsse von Pentaerythritol und besonders Salpetersäure enthalten, was die Stabilität der Verbindung stark beeinträchtigt [Berthmann, 1963]. Aus diesem Grunde wurde der Rückstand zunächst in Aceton gelöst, worauf unlösliches Pentaerythritol präzipitierte und leicht abgetrennt werden konnte und in Aceton lösliches PETN im Filtrat zurückblieb. Nach Zusatz von Wasser und langsamem Abdampfen des Aceton fiel reines PETN wieder aus. Das Endprodukt wurde mit Wasser angefeuchtet gelagert um die Gefahr der Explosion zu vermindern und erst unmittelbar vor der weiteren Verwendung (Synthesen der Metaboliten PETriN und PEDiN s. Kap. 2.2.3 und 2.2.4) in der jeweils benötigten Menge vorsichtig im Exsikkator getrocknet.

Im $^1\text{H-NMR}$ von **5** ist deutlich das Singulett der 4 äquivalenten Methylengruppen bei 4,69 ppm zu erkennen.

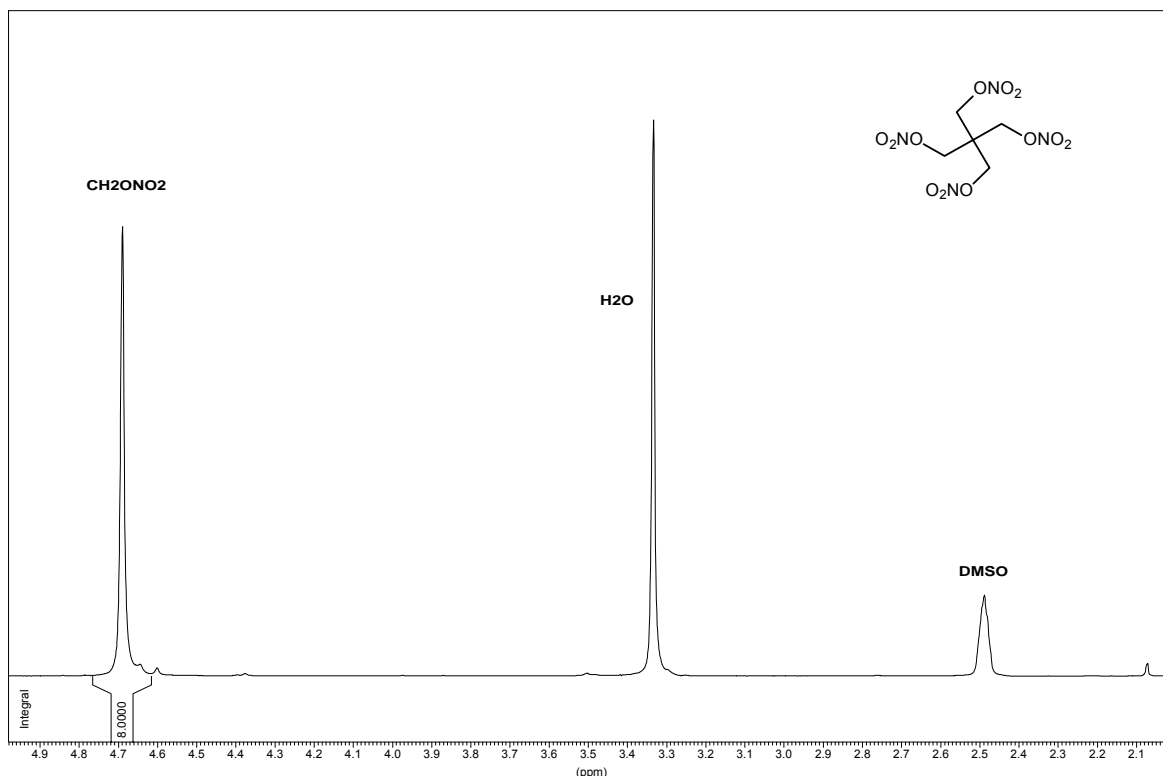


Abb. 2.65: $^1\text{H-NMR}$ von PETN ($[D_6]\text{-DMSO}$) (**5**)

2.2.3 Synthese von Pentaerythritoltrinitrat (PETriN) (**6**)

In einer Einstufensynthese erhielten Camp *et al.* [1955] Pentaerythritoltrinitrat (PETriN) (**6**) in 47%iger Ausbeute durch Nitrierung von Pentaerythritol (**50**) mit 80%iger Salpetersäure und 80%iger Schwefelsäure bei 0°C unter Zusatz von Harnstoff. Dabei entstand als Nebenprodukt vor allem PETN, was eine Aufreinigung unumgänglich machte und die Ausbeute verringerte.

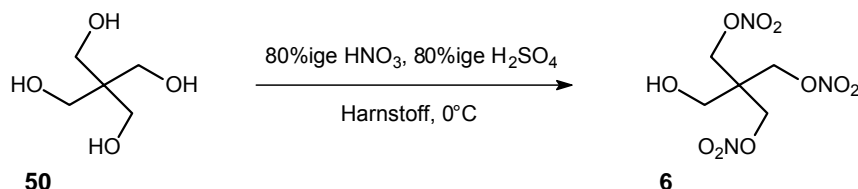


Abb. 2.66: Synthese von PETriN (**6**) nach Camp *et al.* [1955]

In den 60er Jahren wurde diese Synthesemethode von verschiedenen Arbeitsgruppen dahingehend verbessert, daß die Reaktion in einem zweiphasigen Reaktionsmedium bestehend aus Salpetersäure bzw. einem Salpetersäure-/Schwefelsäuregemisch und

Dichlormethan durchgeführt wurde. Die während der Reaktion entstehenden partiell nitrierten Alkohole sollen sich im organischen Lösungsmittel lösen und damit der weiteren Nitrierung entzogen werden. Nach Beendigung der Reaktion kann die organische Phase abgetrennt und aufgearbeitet werden. Brennecke *et al.* [1967] und Rolewicz *et al.* [1968] erhielten auf diese Weise PETriN in zufriedenstellenden Ausbeuten, wobei die Reihenfolge der Zugabe, der Zusatz von Harnstoff und die Konzentration der verwendeten Säuren variierte. Diese Ergebnisse konnten jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Eine Synthese in Anlehnung an Brennecke *et al.* resultierte in einer fast vollständigen Umsetzung des Pentaerythritols zu PETN.

Auch mehrstufige Synthesen für **6** über Pentaerythritolmonoacetat sind in der Literatur bekannt (s. Abb. 2.67). Marans *et al.* [1954] stellten das Monoacetat **51** durch Erhitzen von Pentaerythritol mit Pentaerythritoltetraacetat im Verhältnis 3:1 unter Anwesenheit von Kaliumcarbonat her. **51** entstand hier zunächst im Gemisch mit höheren Acetaten des Pentaerythritol, konnte aber über verschiedene Destillations- und Kristallisationsprozesse in 71,7%iger Ausbeute erhalten werden. Meese *et al.* [1999] beschreiben eine ähnliche, aber umständlichere Synthese von **51** ausgehend von **50** durch Umsetzung mit Essigsäureanhydrid in DMF. Die Aufreinigungsprozesse waren wesentlich aufwendiger und setzten das Vorhandensein reinen Monoacetats als Impfkristall voraus. Diese Reaktion stellte den limitierenden Schritt der gesamten Synthese dar, da nur eine Ausbeute von 15,3 % d.Th. erreicht werden konnte.

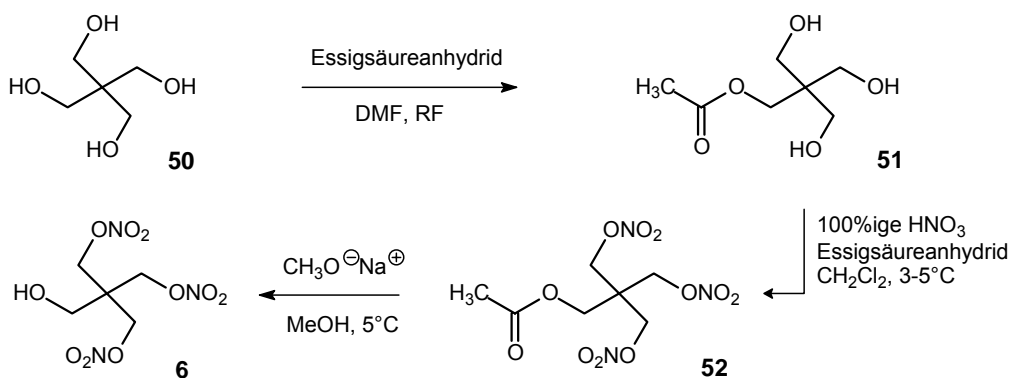


Abb. 2.67: Synthese von **6** nach Meese [1999]

Das entstehende Pentaerythritolmonoacetat **51** wurde anschließend unter Eiskühlung bei Marans *et al.* mit 100%iger Salpetersäure, bei Meese *et al.* mit rauchender Salpetersäure und Essigsäureanhydrid in Dichlormethan fast vollständig in **52** überführt, welches im nächsten Reaktionsschritt mit Natriumhydroxidlösung [Marans, 1954] bzw. Natriummethanolatlösung in THF und Methanol [Meese, 1999] zum PETriN (**6**)

weiterreagierte. Durch die mehrstufige Reaktionsfolge und die umständliche Aufreinigung der einzelnen Reaktionsprodukte stellt dieser Syntheseweg jedoch nicht die Methode der Wahl dar.

Simecek [1962] gelang die Synthese von PETriN (**6**) in 95%iger Ausbeute durch reduktiven Abbau von **5** mit Hydrazinhydrat in einem siedenden Gemisch aus gleichen Teilen Ethanol und Dioxan (s. Abb. 2.68).

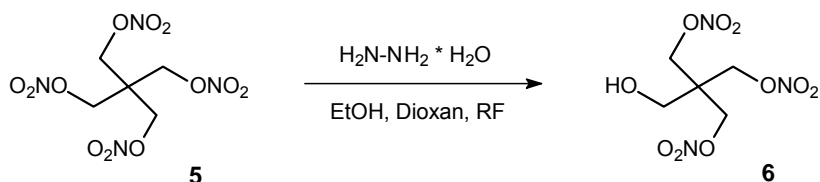


Abb. 2.68: Synthese von PETriN nach Simecek [1962]

Bei dieser Reaktion entstehen ebenfalls weitere Abbauprodukte des PETN wie z.B. Pentaerythritoldinitrat (PEDiN) und Pentaerythritolmononitrat (PEMN), daneben aber auch anorganisches Nitrit, Stickstoff, Stickstoffmonoxid und Ammoniak [Merrow, 1954]. Ein möglicher Mechanismus wurde von Merrow *et al.* [1954] formuliert:

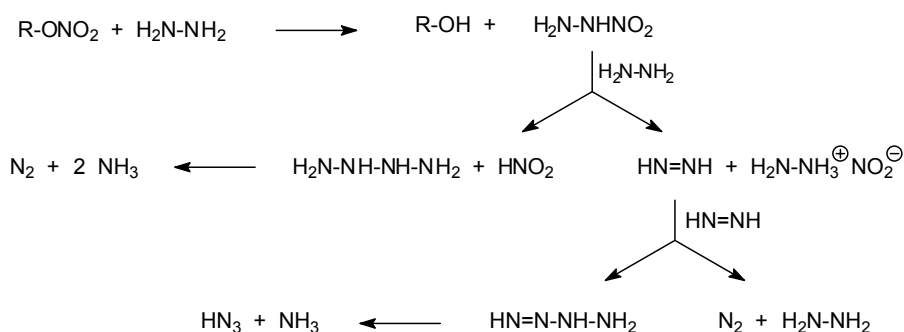


Abb. 2.69: Möglicher Mechanismus der Reduktion organischer Nitrate mit Hydrazinhydrat nach Merrow [1954]

Simecek [1962] beschreibt, daß der reduktive Abbau einer Nitratgruppe 1,2 mol Hydrazinhydrat erfordert und schlägt für die Synthese von PETriN einen Überschuß von 0,1 mol Hydrazinhydrat vor. Hess *et al.* [2001] geben dagegen einen Konzentrationsbereich von 3 – 8 mol Hydrazinhydrat pro mol PETN an. Aufgrund dieser Diskrepanz wurden im Rahmen dieser Arbeit verschiedene Versuche durchgeführt, die die Bestimmung der optimalen Konzentration an Hydrazinhydrat zum Ziel hatten. Der beste Umsatz konnte schließlich mit einem Verhältnis von 2 mol Hydrazinhydrat pro eingesetztes mol PETN erzielt werden.

Neben der dünnschichtchromatographischen Umsatzkontrolle sollte dazu eine exaktere analytische Methode entwickelt werden. Als besonders vorteilhaft erwies sich für die Synthese von PETriN und PEDiN die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), hier speziell die HPLC-Methode A (s. Kap. 5.1.4), die die beste Auftrennung der Substanzen PETN, PETriN und PEDiN gewährleistete. Die Identitätssicherung der Abbauprodukte des PETN erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten zweier aufeinanderfolgender Chromatographieläufe von Referenz und Probe. Alle Verbindungen konnten basisliniengetrennt voneinander detektiert werden mit Ausnahme von PEMN, welches aufgrund seiner hohen Polarität unter diesen Bedingungen immer in der Nähe des Injektionspeaks erschien.

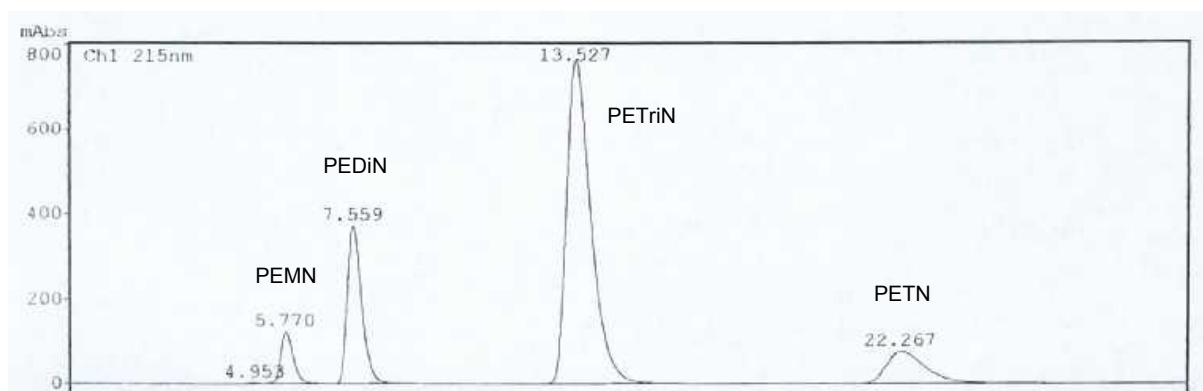


Abb. 2.70: Chromatogramm eines Gemisches aus PETN, PETriN, PEDiN und PEMN unter den Bedingungen der HPLC-Methode A

Unter analytischer Kontrolle konnten die Synthesebedingungen ausgehend von Simecek [1962] und Hess *et al.* [2001] überprüft und verbessert werden.

Das Verhältnis von organischem Lösungsmittel und Wasser ist entscheidend für den Verlauf der Reaktion, da PETN in Wasser fast unlöslich ist und es bei einer zu großen Wassermenge zu einem Präzipitieren des PETN und damit zum Entzug dieser Substanz von der weiteren Reaktion kommen kann. Das im Reaktionsgemisch verbleibende Hydrazinhydrat reduziert dann bevorzugt das besser lösliche PETriN und die niederen Nitrate, wodurch sich die Ausbeute extrem verringert. Die Menge an organischem Lösungsmittel wurde daher für die verwendete Einwaage an PETN im Vergleich zur Originalvorschrift von Simecek etwa verzweifacht. Optimale Konzentrationsverhältnisse aller anderen Reaktanden fanden sich wie im experimentellen Teil beschrieben.

Die Umsatzkontrolle der Reaktion erfolgte mit HPLC-Methode A. Anhand des Kurvenverlaufes in Abb. 2.71 ist erkennbar, daß ein kontinuierlicher Abbau des PETN bei gleichzeitigem Konzentrationsanstieg des PETriN erfolgt. Die Ursache für das leichte Abfallen der Konzentrationskurve des PETriN ab etwa 180 min nach Beginn der Hydrazinhydratzugabe liegt im weiteren Abbau durch Hydrazinhydrat u.a. zu PEDiN, PEMN und Pentaerythritol. Durch die Umsatzkontrolle mittels HPLC konnte die maximale Konzentration an PETriN im Verlauf der Reaktion in mehreren Versuchen bei etwa 180 min bestimmt werden, so daß die Synthese an dieser Stelle abgebrochen werden konnte.

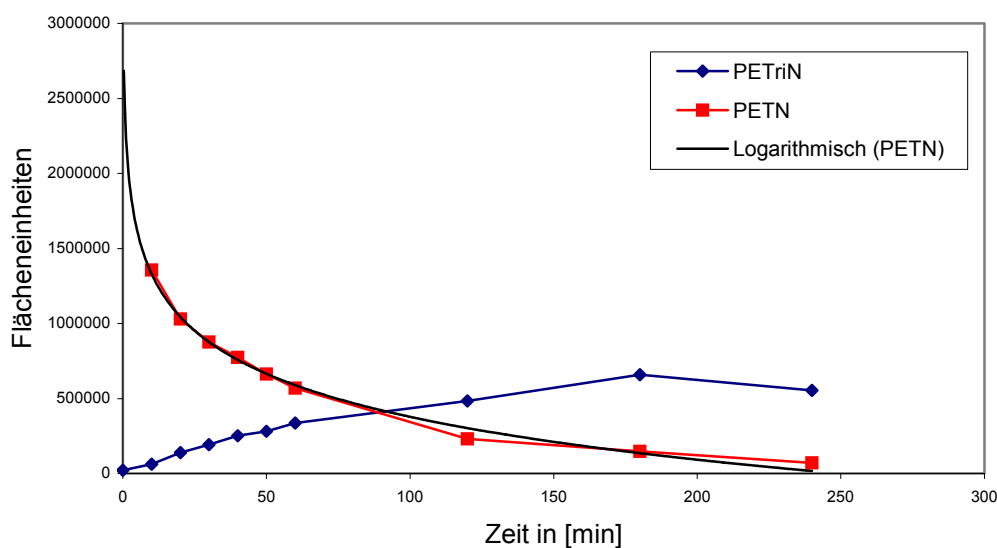


Abb. 2.71: Konzentrationsverlauf bei der Synthese von PETriN mit Hydrazinhydrat

Abweichend von Simecek [1962] gelang die Aufreinigung des PETriN durch Extraktion des Reaktionsgemisches mit Dichlormethan. Dünnschichtchromatographische Kontrolle des nach Abziehen des Lösungsmittels verbleibenden schwach gelben Öls mit Ethylacetat/Toluol (20/80) und Detektion mit Kaliumiodid-Stärke-Lösung oder Diphenylamin in konz. Schwefelsäure als Sprühreagenzien ergab, daß der Rückstand hauptsächlich PETriN, aber auch geringe Mengen an PETN und PEDiN enthielt (Retentionsfaktoren auf der DC: PETN 0.88; PETriN 0.47; PEDiN 0.10). Aufgrund der guten dünnschicht-chromatographischen Trennung wurde die Aufreinigung des öligen Rückstandes säulenchromatographisch durchgeführt. Auf diese Weise war es möglich PETriN in einer Ausbeute von 67 % rein zu gewinnen.

Im $^1\text{H-NMR}$ von **6** sieht man bei 4,60 ppm das Singulett der zu den Nitratgruppen benachbarten Methylengruppen stark tieffeldverschoben im Vergleich zum Dublett der Hydroxymethylgruppe. Daran wird die stark entschirmende Wirkung der Nitratgruppen

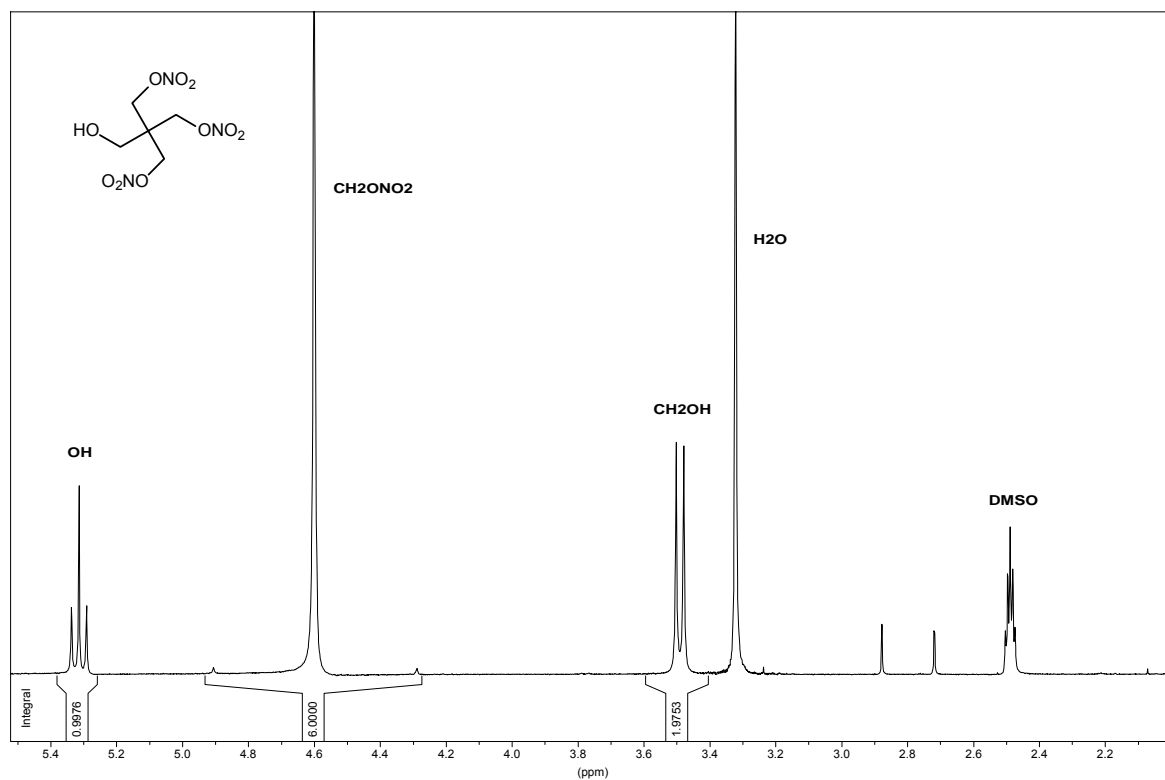


Abb. 2.72: ^1H -NMR von PETriN ($[\text{D}_6]$ -DMSO)(6)

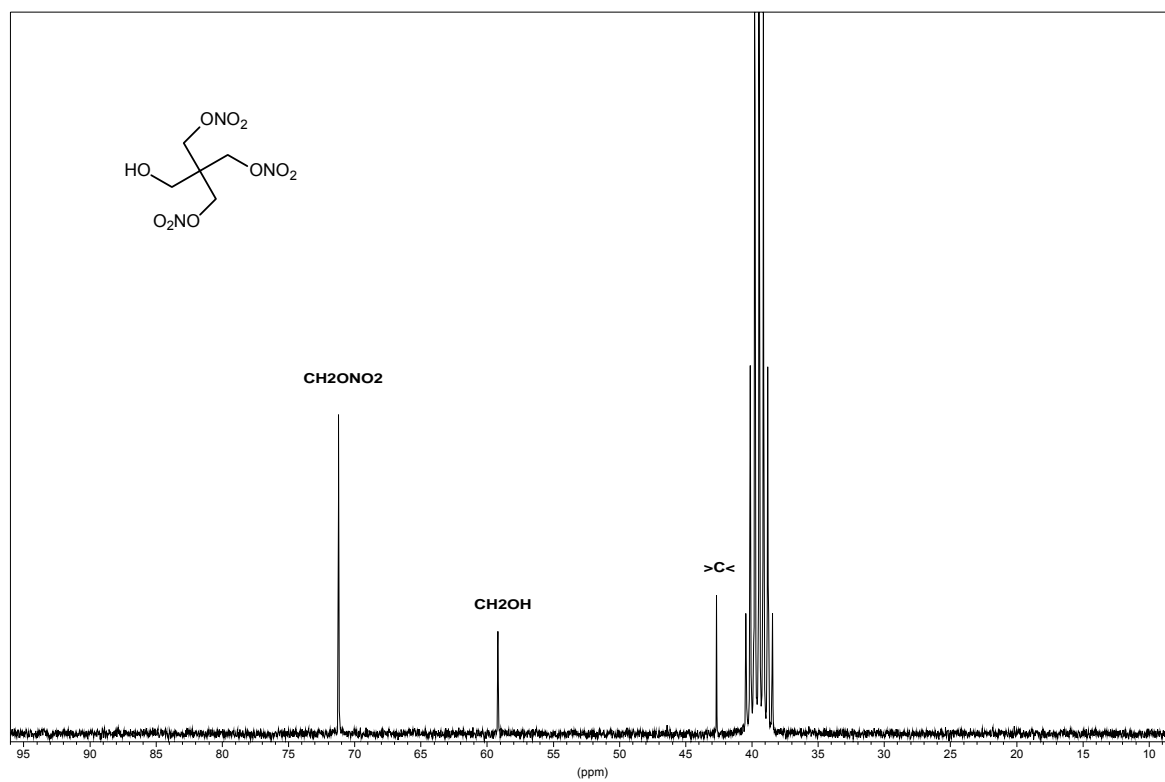


Abb. 2.73: ^{13}C -NMR von PETriN ($[\text{D}_6]$ -DMSO)(6)

deutlich. Diese bewirken aufgrund ihrer ausgeprägten elektronenziehenden Eigenschaften eine Verringerung der Elektronendichte im Bereich der benachbarten Methylengruppe, so daß die dort befindlichen Kohlenstoff- und Wasserstoffkerne ein Magnetfeld erfahren, das relativ gesehen stärker ist im Vergleich zu einem Feld in einer Region höherer Elektronendichte. Das bedeutet wiederum, daß ein niedrigeres äußeres Feld angelegt werden muß, um diese Kerne in Resonanz zu bringen. Eine geringere Elektronendichte bewirkt somit eine Entschirmung des entsprechenden Kerns und damit eine Resonanz bei relativ niedrigem Feld, was einen hohen σ -Wert nach sich zieht.

Die Protonen der anderen Methylengruppe koppeln mit dem Proton der Hydroxygruppe und erscheinen daher als Dublett bei 3,49 ppm, während sich das Signal des OH-Protons als Triplet bei 5,32 ppm zeigt. Die vicinalen Kopplungskonstanten von 5,7 Hz stimmen überein.

2.2.4 Synthese von Pentaerythritoldinitrat (PEDiN) (**7**)

Korolev *et al.* [2003] gelang die Synthese des PEDiN über die Nitrierung von Pentaerythritol mit konz. Salpetersäure in 1,2-Dichlorethan bei -5°C . Mehrfache Extraktionsschritte führten letztlich zu einer Ausbeute von 43 %.

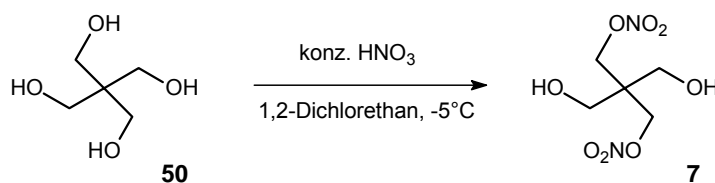


Abb. 2.74: Synthese von PEDiN (**7**) nach Korolev *et al.* [2003]

Goldstein *et al.* [1966] wählten eine andere Route zur Synthese von **7** indem sie Pentaerythritol tetrakis(trifluoroacetat) **53** mit Pentaerythritol **50** (in äquimolarem Verhältnis) und wasserfreies Kaliumcarbonat bei 150°C zur Schmelze brachten. Das so erhaltene Diacetat **54** wurde anschließend im Sinne einer Veresterung mit 99%iger Salpetersäure bei Temperaturen unter 5°C versetzt (s. Abb. 2.75) (**55**). Nach Abspaltung der Acetylreste durch Rühren der Substanz in einer Lösung aus 50%igem wässrigen Methanol mit Kaliumcarbonat und darauf folgender Aufreinigung konnte PEDiN (**7**) von Goldstein *et al.* in einer Ausbeute von 47 % und einer Reinheit von über 95 % erhalten werden. Als Nebenprodukt entstand hauptsächlich PETriN.

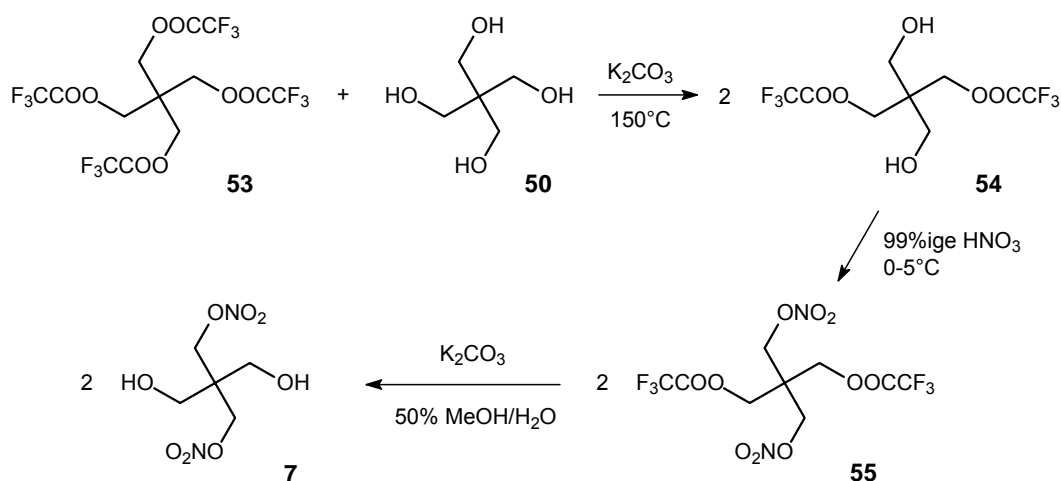


Abb. 2.75: Synthese von **7** aus Pentaerythritol tetrakis(trifluoroacetat) (**53**) nach Goldstein et al. [1966]

Die versuchte Synthese von **7** nach Hakimelahi et al. [1984] in THF mit Thionylchloridnitrat (s. Kap. 2.2.1) führte nach mehrtägiger Reaktionsdauer nur in geringer Ausbeute zu Gemischen aus partiell nitrierten Verbindungen und unverändertem **50**, so daß diese Synthesestrategie nicht weiter verfolgt wurde.

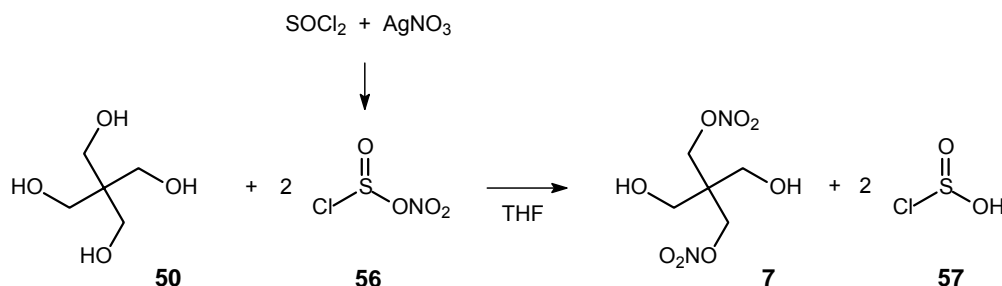


Abb. 2.76: Syntheschema zur Darstellung von **7** nach Hakimelahi et al. [1984]

Aufgrund der schlechten Reaktivität und Selektivität wurde daher ein Umweg über Benzylidenpentaerythritol **59** mit anschließender Nitrierung versucht. Bograchov [1950] synthetisierte **59** in einer Ausbeute von 80 % durch äquimolare Umsetzung von Pentaerythritol mit Benzaldehyd **58** in Wasser unter Anwesenheit von konz. Salzsäure. Dieses Ergebnis konnte leider nicht reproduziert werden. Bei der Nacharbeitung entstanden laut GC/MS-Methode A Mono- und Dibenzylidenpentaerythritol (**60**) im Verhältnis 1 : 23. Die Methode wurde dahingehend geändert, daß **50** zunächst in Wasser unter leichtem Erwärmen auf $40^\circ C$ mit HCl versetzt und anschließend über zwei Stunden eine Lösung von **58** in äquimolarem Verhältnis zugetropft wurde. Dabei entstand ein weißer, kristalliner NS, der lt. GC/MS aus gleichen Teilen **59** und **60** bestand.

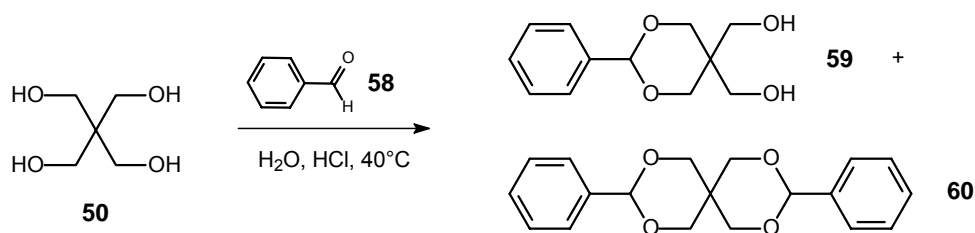


Abb. 2.77: Synthese von Benzyldenpentaerythritol **59**

Um Nebenreaktionen wie die Bildung von **60** zu unterbinden, wurde ein Versuch mit 2,2-Bis(brommethyl)-1,3-propandiol (**61**) unternommen, bei dem zwei der vier Hydroxygruppen des Pentaerythritol durch Bromsubstituenten ersetzt und damit für die Acetalbildung nicht zur Verfügung standen. Die schlechte Löslichkeit der Substanz in Wasser erforderte jedoch, abweichend von der Synthesevorschrift von Bograchov [1950], ein Erwärmen des Reaktionsgemisches zu Beginn der Umsetzung. Nach zwei Tagen bei Raumtemperatur und anschließender Aufarbeitung fielen weiße Kristalle an, deren Reinheit mit GC/MS Methode A auf 100 % bestimmt werden konnte.

Die Ausbeute betrug 77 %.

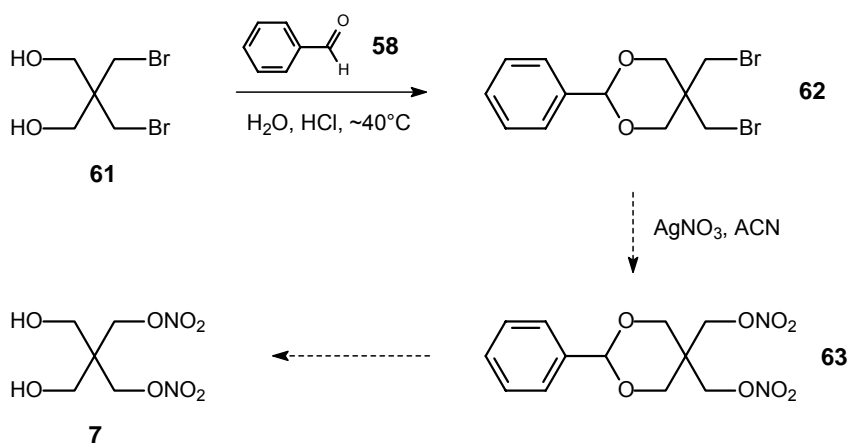
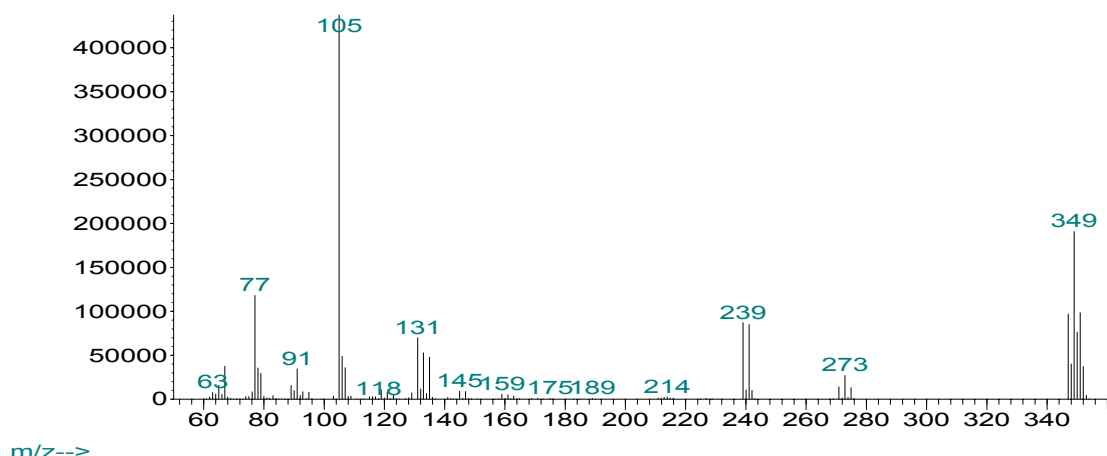


Abb. 2.78: Synthese von PEDiN (**7**) über die Bildung der Benzylidenverbindung **62**

Das Massenspektrum von **62** ist in Abb. 2.79 dargestellt. Wie man anhand des Isotopenverhältnisses der Signale im Bereich von $m/z = 347:349:351$ bzw. $348:350:352$ erkennen kann, liegen im Molekül zwei Bromatome vor.

Abundance

Abb. 2.79: Massenspektrum von **62**

Die weitere Umsetzung von **62** mit Silbernitrat in Acetonitril lieferte jedoch auch nach mehreren Tagen kein einheitliches Endprodukt. Da eine Trennung der Dinitratverbindung **63** von partiell bromierten Verbindungen aufgrund der ähnlichen Eigenschaften (z.B. Löslichkeit, R_F -Werte) nicht möglich war, wurde auch diese Synthesestrategie nicht weiter verfolgt.

Die Synthese von PEDiN gelang schließlich in Anlehnung an die Synthese von PETriN mit Hydrazinhydrat (s. Kap. 2.2.3), allerdings mußten auch hier die Reaktionsbedingungen angepaßt werden. So wurden pro mol PEDiN 8 mol Hydrazinhydrat eingesetzt und die Reaktionszeit von 180 min auf 300 min erhöht. Die Umsatzkontrolle wurde mit HPLC-Methode A durchgeführt.

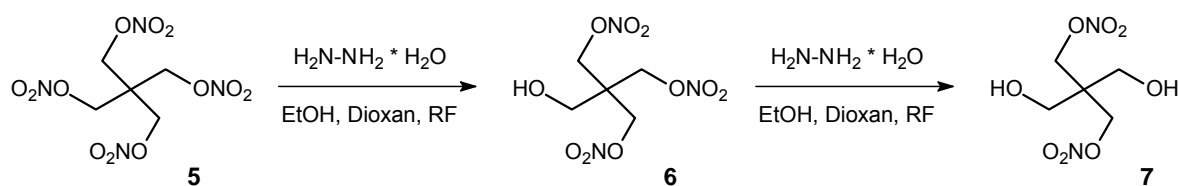


Abb. 2.80: Synthese von PEDiN in Anlehnung an Simecek [1962]

In Abb. 2.81 ist der Reaktionsverlauf beginnend bei der Zugabe des Hydrazinhydrat zu erkennen: PETN wird sofort durch Hydrazinhydrat abgebaut, dabei entsteht zunächst bevorzugt PETriN. Im Verlaufe der Reaktion wird jedoch auch dieses durch überschüssiges Hydrazinhydrat weiter zum PEDiN und nachfolgend wahrscheinlich zum PEMN und PE reduziert.

Der langsame Anstieg der Konzentrationskurve des PEDiN bis zu etwa 300 min nach beginnender Hydrazinhydrat-Zugabe unterstützt diese Vermutung. Wie in Abb. 2.81 erkennbar, war auch nach 300 min das Hydrazinhydrat nicht völlig verbraucht, so daß noch ein Abbau des PEDiN in geringem Maße erfolgte. Nach 500 min stellte sich dann ein Plateau ein und die Konzentration an PEDiN nahm nicht weiter ab (nicht abgebildet).

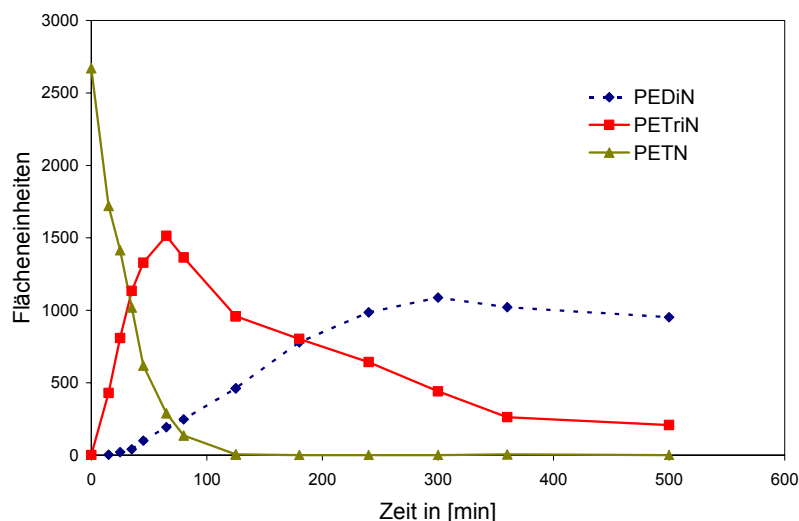


Abb. 2.81: Reaktionsverlauf der Reduktion von PETN mit Hydrazinhydrat

Die Reaktion wurde 300 - 330 min nach beginnender Zugabe des Reduktionsmittels abgebrochen. Nach Extraktion mit Ethylacetat und säulenchromatographischer Aufreinigung konnte PEDiN in 43%iger Ausbeute rein erhalten werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung von PEDiN besteht in der Umsetzung von 2,2-Bis(brommethyl)-1,3-propandiol (**61**) mit Silbernitrat in trockenem Acetonitril in Anlehnung an die Synthese des 1,2-GDN (s. Kap. 2.2.1 und 2.2.6) (s. Abb. 2.82). Goldstein *et al.* [1966] berichten, daß die Reaktion der Dibromverbindung **61** sehr langsam verläuft (90 Tage bei Raumtemperatur), dementsprechend wurde die Reaktion im Rahmen dieser Arbeit nicht bei Raumtemperatur, sondern bei 60°C und zusätzlich unter Lichtschutz durchgeführt. Die Umsatzkontrolle erfolgte über die Auswaage des ausgefallenen und in regelmäßigen Abständen abfiltrierten Silberbromids. Ein 100%iger Umsatz konnte nicht erzielt werden.

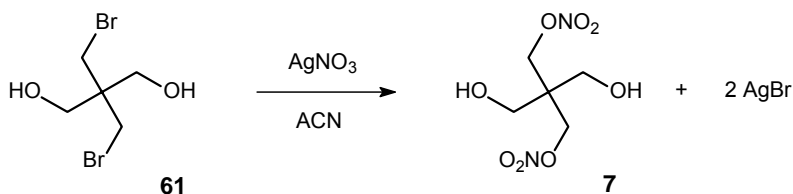


Abb. 2.82: Synthese von PEDiN durch Umsetzung der Dibromverbindung **61** mit Silbernitrat

Im Unterschied zur Synthese des PEDiN aus PETN mit Hydrazinhydrat konnte die Darstellung des PEDiN aus 2,2-Bis(brommethyl)-1,3-propandiol (**61**) mit Silbernitrat nur bedingt mittels HPLC-Methode A überwacht werden, da Edukt und Produkt aufgrund ihres ähnlichen chromatographischen Verhaltens nicht basisliniengetreunt nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 2.83).

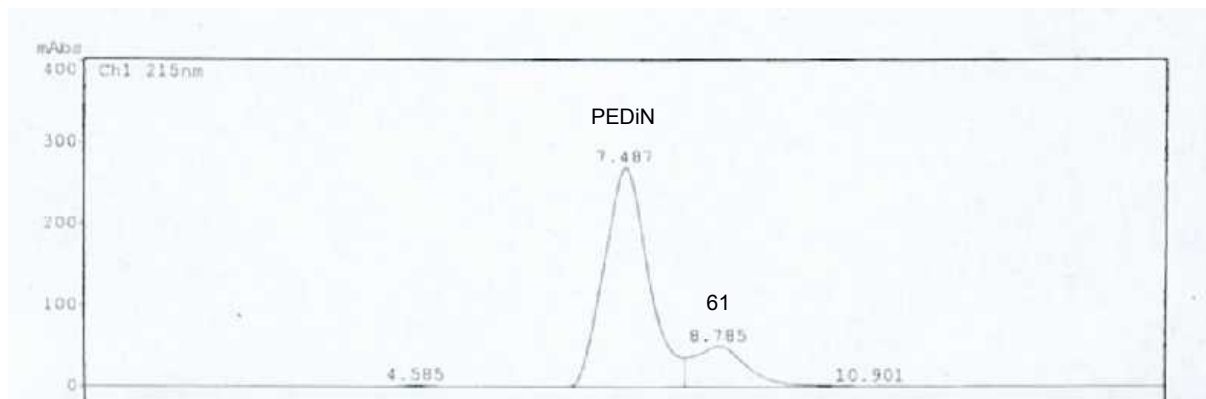


Abb. 2.83: HPLC-Chromatogramm eines Gemisches aus PEDiN und 2,2-Bis(brommethyl)-1,3-propandiol (**61**)

Nach 14 Tagen wurde die Reaktion abgebrochen und die überschüssigen Silberionen wie bei 1,2-GDN beschrieben, mit einer gesättigten Natriumchloridlösung ausgefällt und abfiltriert (s. Kap. 2.2.6). Das nach erster Extraktion mit Ethylacetat erhaltene orange-gelbe Öl konnte nach dem Verfahren der „fraktionierten Extraktion“ (s. Kap. 2.2.5) weiter aufgereinigt werden, wobei PEDiN und Reste von **61** unterschiedlich in den verschiedenen Etherphasen anfielen. Nach Vereinigung der mittels HPLC-Methode A ausgewählten reinen Etherphasen betrug die Ausbeute 75 %.

Das ^1H -NMR-Spektrum des PEDiN ist mit dem des PETriN (s. Kap. 2.2.3) vergleichbar, Unterschiede ergeben sich jedoch durch die unterschiedlichen Intergrationen und geringfügig verschiedenen chemischen Verschiebungen der einzelnen Signale. So ist das durch Kopplung mit den OH-Gruppen entstehende Dublett bei 3,40 ppm ebenfalls den Methylenprotonen der zwei Hydroxymethylengruppen zuzuordnen. Durch die Nachbarschaft der Nitratgruppen erscheinen die Signale der zwei anderen Methylengruppen im Vergleich dazu erwartungsgemäß stark tieffeldverschoben als Singulett bei 4,52 ppm. Das Signal bei 4,95 ppm konnte durch D_2O -Austausch eindeutig den Protonen der zwei Hydroxygruppen zugeordnet werden, welche durch Kopplung mit den benachbarten Methylengruppen als Triplett erscheinen. Die Kopplungskonstanten von Dublett und Triplett stimmen überein (5,6 Hz) und bestätigen damit die Zuordnung.

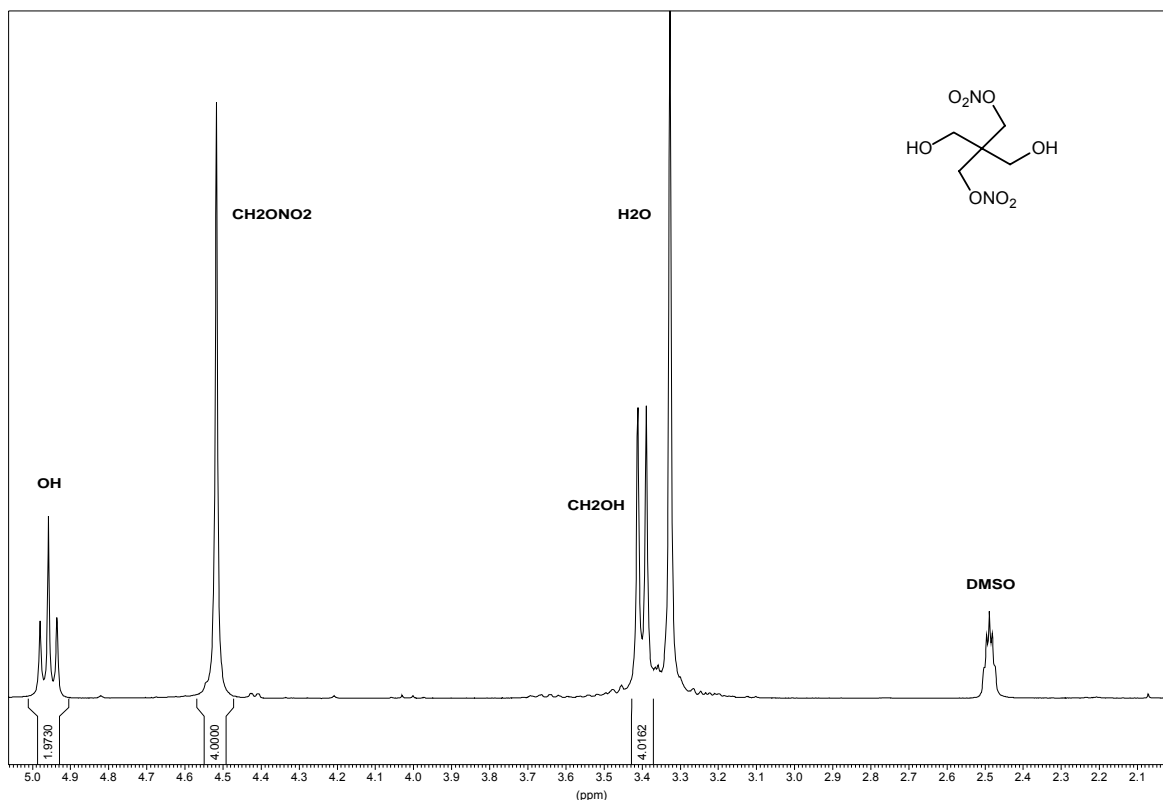


Abb. 2.84: ^1H -NMR von PEDiN ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$) (**7**)

Eine Möglichkeit zur Verringerung der Reaktionsdauer durch Erhöhung der Reaktionsfähigkeit des Eduktes **61** bietet die Finkelstein-Reaktion (s. Kap. 2.1.9), eine nucleophile Halogenidaustauschreaktion zur Synthese von Iodiden, welche aus der Literatur z.B. für 2,2-Bis(iodmethyl)-1,3-propandiol und ähnliche Verbindungen bekannt ist. Chopin *et al.* [2005] stellte auf diese Weise aus 2,2-Bis(brommethyl)-1,3-propandiol (**61**) die entsprechende Diiodverbindung **64** her, Elrick *et al.* [1954] gelang die Darstellung von 2,2-Bis[(nitrooxy)methyl]-3-(iod)propylnitrat aus der entsprechenden Bromverbindung. Beide führten die Reaktion in trockenem Aceton unter Zugabe von entweder NaI bzw. KI im Überschuß durch. Chopin *et al.* berichten von einer 3-tägigen Reaktionsdauer, bei Elrick *et al.* erhöhte sie sich – wahrscheinlich sterisch bedingt – auf etwa 8 Tage. Die Ausbeuten differierten zwischen 96 % und 41 %.

Entsprechend der Vorschrift von Elrick *et al.* [1954] wurde **61** mit einem Überschuß an KI in Aceton umgesetzt und die Synthese mit GC/MS-Methode A überwacht. Dabei konnte festgestellt werden, daß nach 7 Tagen ein Gemisch von Substanzen entstanden war, die z.T. noch Bromsubstituenten enthielten. Die Verbindungen konnten leider nicht voneinander getrennt werden. Ein Syntheseversuch mit Natriumiodid in trockenem Aceton zeigte ebenfalls nach 3-tägiger Reaktionsdauer bei 40°C und anschließender

Aufarbeitung im NMR keinen einheitlichen Stoffumsatz. Auf eine anschließende Umsetzung mit Silbernitrat wurde daher verzichtet.

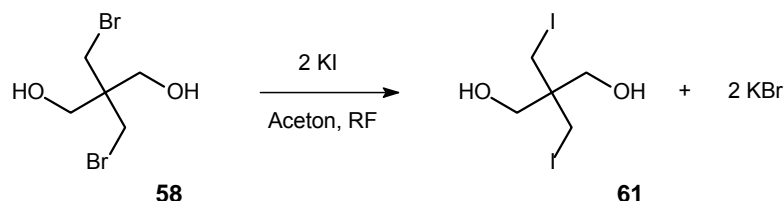


Abb. 2.85: Finkelstein-Reaktion von **61** in Anlehnung an Elrick *et al.* [1954]

2.2.5 Synthese von Pentaerythritolmononitrat (PEMN) (**8**)

Wie schon bei der Synthese von PETriN und PEDiN beschrieben (s. Kap. 2.2.3 und 2.2.4), kann die Gewinnung des PEMN auch über einen reduktiven Abbau des PETN mit Hydrazinhydrat erfolgen. Da jedoch im Verlauf der Reaktion zunächst PETriN, zeitlich versetzt PEDiN und schließlich PEMN sowie weitere Abbauprodukte wie Pentaerythritol, Nitrit und Ammoniak entstehen, ist die Synthese schlecht steuerbar und die Ausbeute gering. Eine Trennung der verschiedenen Nitrate ist über die unterschiedlichen Löslichkeiten möglich, wobei die Isolierung des Mononitrats viele Extraktionsschritte erfordert. Dieser Weg wurde aufgrund der von vornherein zu erwartenden niedrigen Ausbeute nicht weiter verfolgt.

Nach der Nitrierung von **50** mit konz. Salpetersäure in 1,2-Dichlorethan bei -5°C und Abtrennung des PEDiN (s. Kap. 2.2.4) gelang Korolev *et al.* [2003] die Isolierung von **8** über mehrfache Extraktionsschritte, die letztlich jedoch nur zu einer Ausbeute von 8,2 % führten.

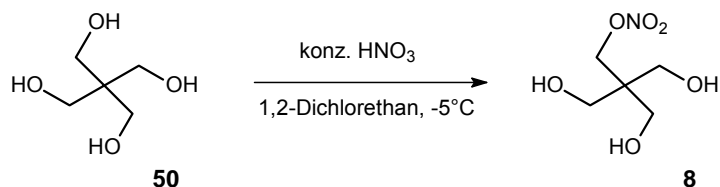


Abb. 2.86: Synthese von PEMN nach Korolev *et al.* [2003]

Goldstein *et al.* [1966] synthetisierten PEMN (**8**) abweichend vom Prozedere zur Herstellung des Dinitrates **7** (s. Kap. 2.2.4) durch Umsetzung von Pentaerythritol tetrakis(trifluoroacetat) **53** mit **50** im Verhältnis 3:1 und anschließender Nitrierung mit 99%iger HNO_3 zu **66**. Die Aufarbeitung des Reaktionsgemisches nach Abspaltung der Acetylreste und Abtrennung des PEMN vom Di- und Trinitrat erwies sich in diesem Fall

jedoch als apparativ aufwendiger, da der abgedampfte Rückstand über 24 Stunden in einer Soxhlet-Apparatur mit Ether extrahiert werden mußte. Nach Umkristallisieren aus Chloroform wurde auch hier reines **8** in 45%iger Ausbeute erhalten.

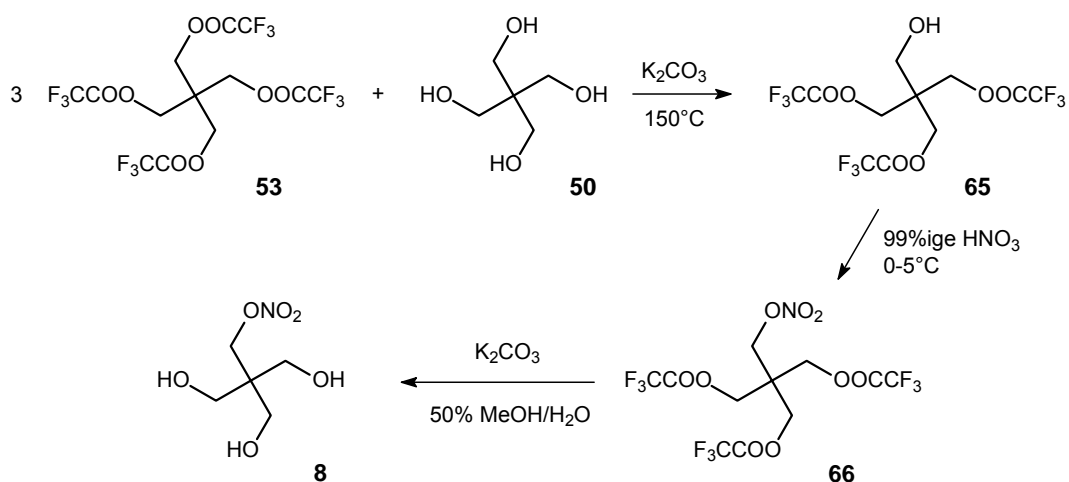


Abb. 2.87: Synthese von PEMN (**8**) aus Pentaerythritol tetrakis(trifluoroacetat) (**53**) nach Goldstein [1966]

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Synthese des PEMN durch Reaktion von 3-Brommethyl-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (**67**) mit Silbernitrat in Anlehnung an die Synthese des 1,2-GDN (s. Kap 2.2.6). **67** wurde dabei 7 Tage mit Silbernitrat in trockenem Acetonitril bei $50^\circ C$ umgesetzt. Während der gesamten Reaktionszeit wurde ausgefallenes $AgBr$ in regelmäßigen Abständen aus dem Reaktionsansatz entfernt, so daß über die Menge des entstandenen Niederschlags eine gute Einschätzung des Reaktionsverlaufs möglich war. Ein 100%iger Umsatz konnte jedoch nicht erzielt werden.

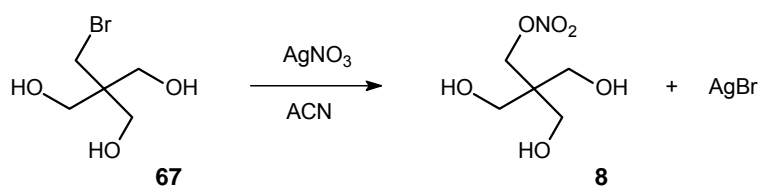


Abb. 2.88: Synthese von PEMN durch Umsetzung von 3-Brommethyl-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (**67**) mit Silbernitrat

Eine zusätzliche chromatographische Umsatzkontrolle mittels einer der etablierten HPLC-Methoden war infolge des nahezu identischen chromatographischen Verhaltens von Brom- und Nitratverbindung nicht möglich. Aufgrund der Tatsache, daß beide Verbindungen drei hochpolare Hydroxygruppen enthalten, läßt sich eine Trennung über den vierten Substituenten kaum erreichen. Beide Substanzen wurden infolge ihrer hohen Polarität immer in der Nähe des Injektionspeaks bei einer nahezu identischen

Retentionszeit detektiert wie am Beispiel der Chromatogramme von PEMN und **67** in Abb. 2.89 und 2.90 erkennbar ist. Eine chromatographische Trennung des Nitrats von der Bromverbindung ist in der Literatur nicht beschrieben. Da eine Umsatzkontrolle auch auf anderem Wege möglich war, wurde auf eine Methodenoptimierung verzichtet.

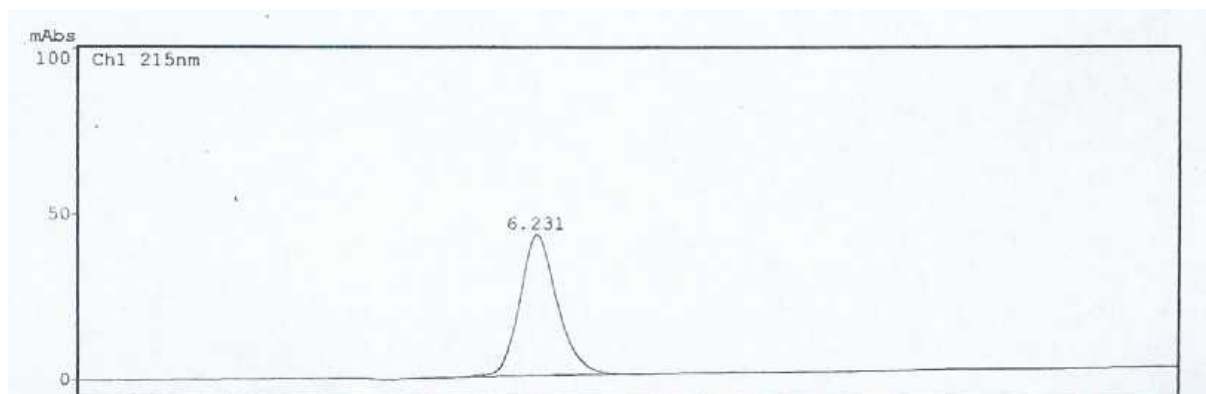


Abb. 2.89: HPLC-Chromatogramm von PEMN (**8**)

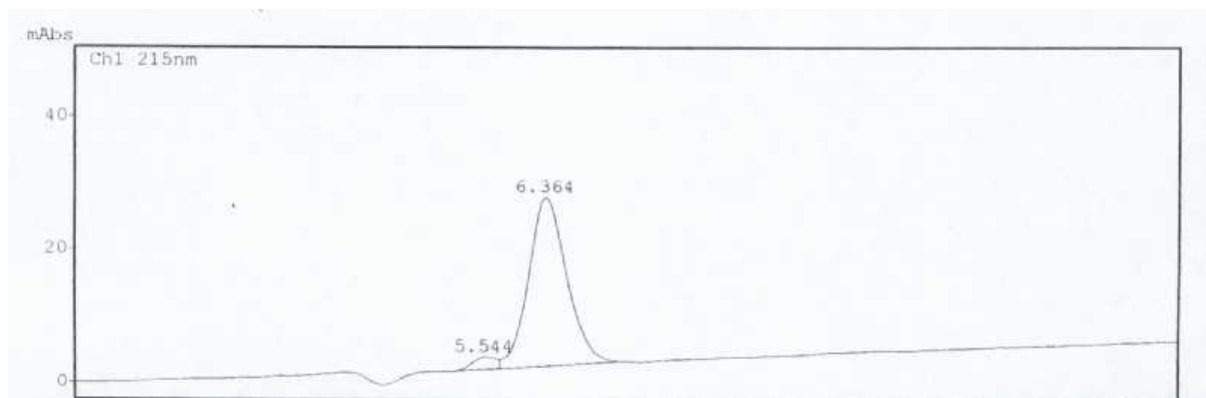


Abb. 2.90: HPLC-Chromatogramm von **67**

Nach Abtrennung des ausgefallenen Silberbromids wurde die organische Phase zunächst, wie in Kap. 2.2.6 erläutert, mit einer gesättigten Natrium-chloridlösung von den überschüssigen Silberionen befreit. Zur Extraktion wurde Ethylacetat gewählt, da PEMN aufgrund seiner hohen Polarität nur schwer aus der Wasserphase zu extrahieren war. Der nach der Extraktion erhaltene Rückstand wurde in einem relativ aufwändigen Aufreinigungsprozeß nach der Methode der „fraktionierten Extraktion“ behandelt. Diese macht sich unterschiedliche Löslichkeiten von eventuell auftretenden Nebenprodukten zunutze und wurde entwickelt um aus einem Reaktionsgemisch die Verbindungen in der Reihenfolge zunehmender Polarität zu trennen. Durch aufeinanderfolgende Extraktionsschritte mit Hexan, Ether, Dichlormethan und schließlich Ethylacetat gelang es unpolare Verbindungen abzutrennen. Das hochpolare PEMN fiel dabei in den Ethylacetatphasen an, welche mit HPLC-Methode A auf Verunreinigungen untersucht und die reinen Phasen

anschließend vereinigt wurden. Der nach Entfernen des Ethylacetats verbleibende weiße Feststoff wurde aus Ether umkristallisiert. Die Ausbeute betrug jedoch nur 22,4 %. Unter Verwendung eines Schwerphasenextraktors zur Erhöhung der aus der Wasserphase extrahierten Menge an PEMN läßt sich die Ausbeute sicherlich noch steigern.

Eine Steigerung der Umsatzgeschwindigkeit bei der Synthese des PEMN konnte durch Erhöhung der Menge an eingesetztem Silbernitrat erreicht werden, jedoch ist das in Anbetracht des hohen Preises für eine Produktion in größerem Maßstab nicht wirtschaftlich.

Um die Reaktionsfähigkeit von **67** mit Silbernitrat zu erhöhen, wurde dieses in Anlehnung an Elrick *et al.* [1954] (s. Kap. 2.2.4) mit einem Überschuß an KI in trockenem Aceton in die Iodverbindung **68** überführt. Die Synthese wurde mittels GC/MS-Methode A überwacht. Dabei konnte festgestellt werden, daß der Umsatz nach drei Tagen etwa die Hälfte betrug, nach 17 Tagen etwa 92%. Eine Verringerung der Synthesedauer bei der Darstellung des PEDiN mit Silbernitrat kann mit dieser Methode daher nicht erreicht werden.

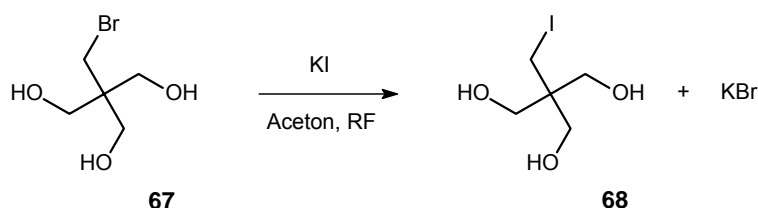


Abb. 2.91: Synthese von **68** über eine Finkelstein-Reaktion mit KI in Aceton

Im ¹H-NMR des PEMN erkennt man bei 3,35 ppm das Signal der drei Hydroxymethylengruppen mit der Integration 6 H als Dublett und tieffeldverschoben bei 4,43 ppm das Signal der Nitrooxymethylengruppe als Singulett, dem aufgrund der Integration zwei Protonen zugeordnet werden können. Ebenso wie beim ¹H-NMR des PEDiN (s. Kap. 2.2.4) konnte auch hier das Triplett, welches bei 4,53 ppm zentriert ist, durch ein D₂O-Austauschspektrum den drei OH-Protonen zugeordnet werden. Anhand der mit den Hydroxymethylenprotonen übereinstimmenden Kopplungskonstanten von 5,5 Hz konnte die Zuordnung zusätzlich abgesichert werden.

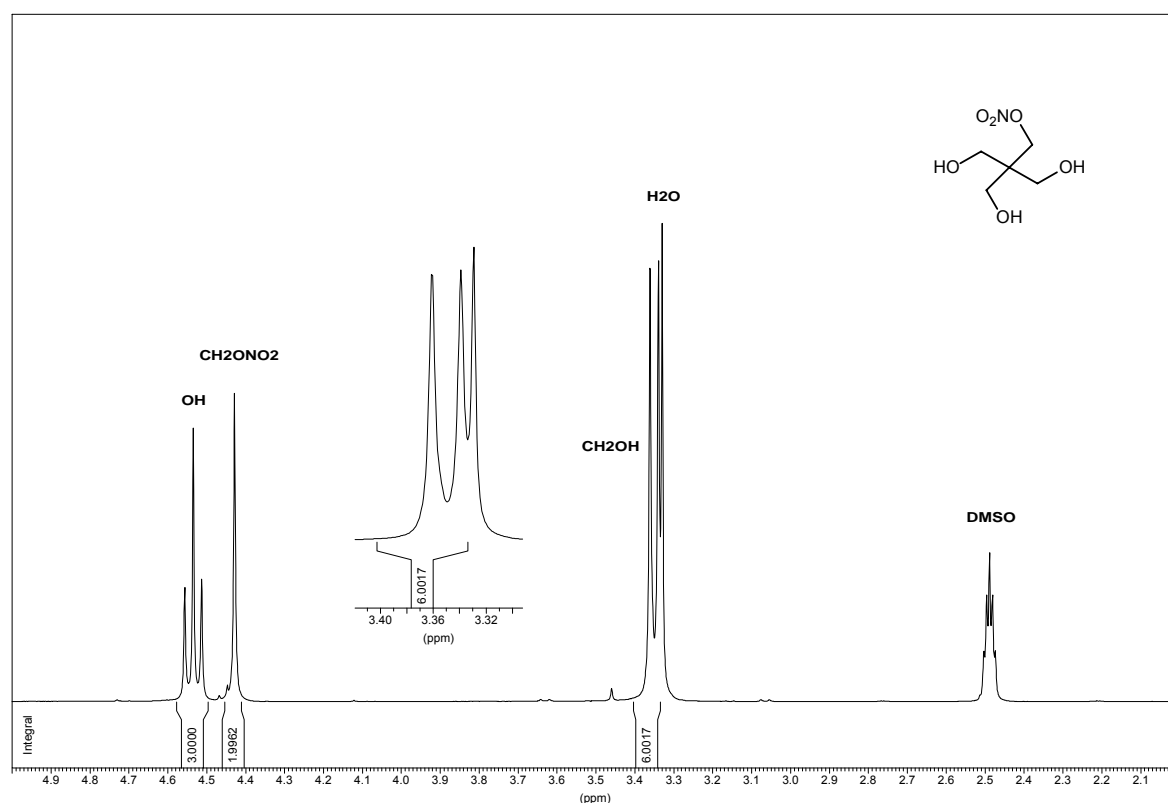


Abb. 2.92: ^1H -NMR von PEMN ($[\text{D}_6]$ -DMSO)(8)

2.2.6 Synthese von Glycerol-1,2-dinitrat (1,2-GDN) (10)

Die direkte Nitrierung von Glycerol führt zwangsläufig zu Gemischen mit 1,3-GDN und anderen partiell nitrierten Verbindungen. Dunstan *et al.* [1965 a] beschreiben die Synthese von 1,3-GDN und 1,2-GDN durch Nitrierung mit einem Gemisch aus konz. Salpetersäure und konz. Schwefelsäure, wobei die Dinitrate zunächst im Verhältnis 80:20 entstanden. Eine Isolierung des 1,2-GDN wurde hier jedoch nicht durchgeführt, sondern nur das 1,3-GDN aufgereinigt.

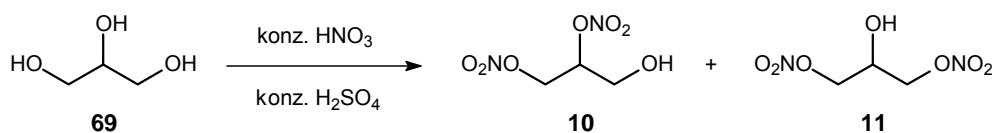


Abb. 2.93: Synthese von 1,2-GDN und 1,3-GDN durch direkte Nitrierung von Glycerol

Auch die Nitrierung mit hochkonzentrierter Salpetersäure bei Temperaturen von 12 – 20 °C führte nach Köhler [1986] zu Gemischen aus 1,2-GDN mit 1,3-GDN und den Mononitraten, die allerdings durch mehrfache Extraktionsprozesse und anschließende chromatographische Aufreinigung mittels HPLC abgetrennt werden konnten. Ausbeuten werden in diesem Patent jedoch nicht beschrieben. Bei Berthmann [1963] werden Synthesemethoden mit beiden Nitrierungsmitteln beschrieben, die zunächst zu Gemischen aller Glycerolnitate führten, aus denen die Dinitrate ebenfalls durch Extraktionsprozesse isoliert wurden. Eine Trennung der beiden Isomeren gelang durch Ausnutzung der Tatsache, daß das symmetrische 1,3-GDN im Gegensatz zum 1,2-GDN mit Wasser im molaren Verhältnis 3:1 ein kristallisierendes Hydrat (Schmelzpunkt 26°C) bildet, welches z.B. aus Ethanol oder Ether umkristallisiert werden kann. Über die Reinheit des verbleibenden 1,2-GDN wird jedoch keine Angabe gemacht. Ein großes Problem bei der direkten Nitrierung von Glycerol ist die Möglichkeit des Entstehens großer Mengen des starken Sprengstoffs GTN.

Eine selektive Synthese von 1,2-GDN gelingt über zyklische Isopropylidenacetale. So wurde 2,2-Dimethyl-4-hydroxymethyl-1,3-dioxolan (**70**) von Legocki *et al.* [1967] zunächst mit Acetanhydrid in Pyridin bei 0°C zu der acetylierten Verbindung **71** und anschließender Ringöffnung mit 98%iger Salpetersäure unter Anwesenheit von Harnstoff bei –5 bis –10°C zum Dinitrat **72** umgesetzt. Hydrolyse des Essigesters mit konz. Salzsäure in Methanol und anschließende Aufreinigung lieferte reines 1,2-GDN (**10**).

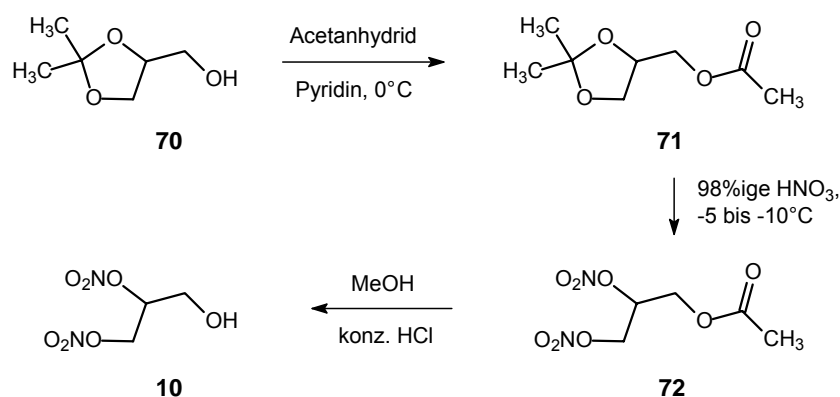


Abb. 2.94: Synthese von 1,2-GDN nach Legocki *et al.* [1967]

Ausgehend vom Dioxolan **70** beschrieben Dufresne *et al.* [2005] eine Synthese, in der dieses ebenfalls mit Acetanhydrid allerdings unter Verwendung von DMAP in Dichlormethan umgesetzt und während der nachfolgenden Veresterung mit einem Gemisch aus konz. Salpetersäure und konz. Schwefelsäure bei 0°C in das Dinitrat **72** überführt wurde. **72** wurde anschließend nicht, wie bei Legocki *et al.*, mit konz. Salzsäure

in Methanol, sondern mit Natriumhydroxid in Ethanol gespalten. Auf die Reinheit des Produktes und die Ausbeute wird in diesem Patent allerdings nicht eingegangen.

Colclough *et al.* [2001] verwendeten, ausgehend vom Glycidol, Distickstoffpentoxid als Nitrierungsreagenz und konnten auf ihrem Weg sowohl 1,2-GDN als auch 1,3-GDN (s. Kap. 2.2.7) selektiv unter milden Bedingungen und in hohen Ausbeuten synthetisieren. Zunächst wurde dabei ein Trialkylsilylether-Derivat von Glycidol durch Reaktion mit tert-Butyldimethylsilylchlorid in Dichlormethan unter Zusatz von Triethylamin bei Temperaturen unter 5°C dargestellt, welches im nächsten Schritt mit Distickstoffpentoxid in Dichlormethan unter wasserfreien Bedingungen bei 0°C nitriert wurde. Das so erhaltene Dinitrat konnte schließlich mit DDQ in Acetonitril zum 1,2-GDN entschützt werden. In allen drei Schritten wurden jeweils Ausbeuten über 89 % erreicht.

Als vielversprechendste Methode zur Herstellung von 1,2-GDN (**10**) erschien die Umsetzung von 2,3-Dibrompropan-1-ol (**73**) mit Silbernitrat in Acetonitril in Anlehnung an Dunstan *et al.* [1965 a], welche die Herstellung des 1,3-GDN in analoger Weise beschrieben (s. Kap. 2.2.7).

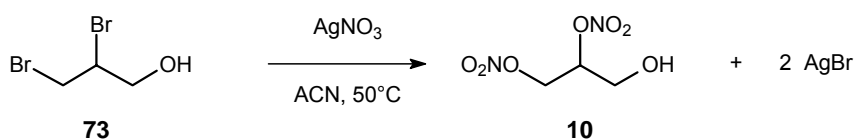


Abb. 2.95: Synthese von 1,2-GDN in Anlehnung an Dunstan *et al.* [1965 a]

Für die Synthese des 1,2-GDN war jedoch eine größere Menge an Silbernitrat nötig, da unter gleichen Reaktionsbedingungen unverändertes Bromedukt zurückblieb. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Reaktivität von **73** bei der Umsetzung mit Silbernitrat geringer ist als die des Isomers **75**. Vermutlich spielt die sterische Hinderung beim Angriff an den beiden benachbart zu den Bromsubstituenten liegenden Kohlenstoffatomen eine entscheidende Rolle. Für die Synthese von **10** im Rahmen dieser Arbeit wurden die Methoden von Dunstan *et al.* [1965 a] für 1,2-GDN bzw. von Shan *et al.* [2004] für 1,3-GDN miteinander kombiniert.

In einem ersten Versuch wurde **73** zunächst mit einem 2-fachen molaren Überschuß an Silbernitrat in Acetonitril unter Rühren und Lichtschutz umgesetzt. Die Reaktionslösung wurde jedoch abweichend von beiden Arbeitsgruppen nicht zum Rückfluß erhitzt, sondern nur auf 50°C erwärmt. Dies sollte, unter Inkaufnahme einer längeren Reaktionszeit von acht Tagen, das Auftreten möglicher Nebenreaktionen vermindern. Der gesamte

Reaktionsverlauf wurde mittels HPLC-Methode B überwacht. Sowohl Edukt als auch Produkt können mit dieser Methode basisliniengetrennt voneinander detektiert werden.

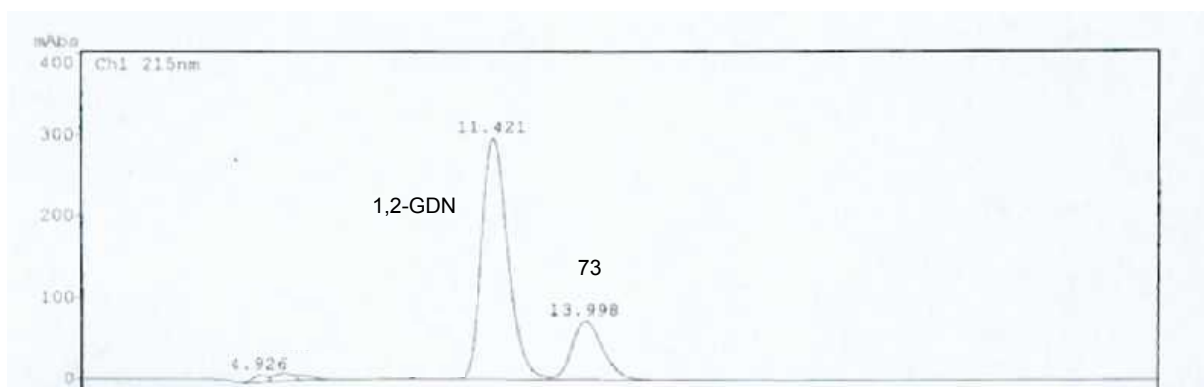


Abb. 2.96: Chromatogramm eines Gemisches aus **73** und 1,2-GDN unter den Bedingungen der HPLC-Methode B

Im Verlauf der Umsetzung der Dibromverbindung mit Silbernitrat erschienen in den Chromatogrammen zwei zusätzliche Peaks, die gegen Ende der Reaktion vollständig verschwanden (nicht abgebildet). Das unterstützt die Hypothese, daß die Silbernitratmetathese nicht zeitgleich an beiden Bromsubstituenten erfolgt, sondern intermediär gemischte Verbindungen sowohl mit Nitrat- als auch mit Bromsubstituenten gebildet werden. Aufgrund der unterschiedlichen Möglichkeiten können sich zwei verschiedene Isomere bilden, die die beiden zusätzlichen Peaks erklären könnten. Im Verlauf der Synthese reagieren dann beide Substanzen mit Silbernitrat weiter zu **10**.

Nach Abbruch der Reaktion erfolgte die Ausfällung der noch in der Lösung befindlichen, überschüssigen Silberionen abweichend von Dunstan *et al.* [1965 a] nicht mit Natriumbromid, sondern mit einer gesättigten Lösung von Natriumchlorid. Die Schwerlöslichkeit des sich bildenden Silberchlorids ist ausreichend um eine fast vollständige Fällung zu erreichen. Ein derartiger Reinigungsschritt war in der Synthesevorschrift von Shan *et al.* [2004] nicht vorgesehen, erwies sich jedoch bei der anschließenden Extraktion mit Dichlormethan von Vorteil. Der Rückstand der vereinigten Dichlormethanphasen wurde bei diesem ersten Syntheserversuch unter DC-Kontrolle säulenchromatographisch aufgereinigt. Die Trennung war schlecht, so daß 1,2-GDN nur in geringen Ausbeuten rein erhalten werden konnte.

Es lag daher nahe, die Reaktionsbedingungen und Aufreinigungsvorgänge zu verbessern. Die Reaktionsgeschwindigkeit konnte maßgeblich durch die Erhöhung der Silbernitratmenge auf das Zehnfache im Vergleich zur eingesetzten Bromverbindung erhöht werden. Dadurch verringerte sich die Reaktionsdauer von ursprünglich acht auf zwei Tage. Zudem wurde die Extraktion des Filtrates nach Abtrennung der Silberhalogenide modifiziert. Wie bereits bei der Synthese des PEMN (s. Kap. 2.2.5) beschrieben, konnte 1,2-GDN durch das Verfahren der „fraktionierten Extraktion“ in den Etherphasen rein isoliert werden. Die Ausbeute betrug dadurch zufriedenstellende 61 %.

Im ^1H -NMR des 1,2-GDN können die Doppeldubletts bei 4,57 - 4,65 ppm bzw. 4,75 - 4,81 ppm den benachbart zur Nitratgruppe liegenden Methylenprotonen zugeordnet werden. Aufgrund der Nachbarschaft zum chiralen Zentrum lassen sich die beiden Protonen weder durch Rotation um eine Symmetrieachse, noch durch Spiegelung an einer Symmetrieebene ineinander überführen. Da ihre magnetische Umgebung somit auch bei völlig freier Rotation um die Bindungsachse verschieden ist, ist das mittlere Feld, das ein Proton während der Drehbewegung spürt inhärent verschieden von demjenigen, dem das andere Methylenproton ausgesetzt ist. Die geminalen H-Atome dieser Methylengruppe sind daher unterschiedlich abgeschirmt, deswegen nicht mehr äquivalent und kommen nicht bei der gleichen Frequenz in Resonanz. Sie sind diastereotop und koppeln miteinander mit einer geminalen Kopplungskonstanten von 13,0 Hz. Jedes der Wasserstoffatome koppelt weiterhin mit dem Methinproton, wobei die jeweiligen vicinalen Kopplungskonstanten verschieden sind. Dem hochfeldverschobenen Doppeldublett läßt sich die vicinale Kopplungskonstante von $^3J = 6,5$ Hz und dem tieffeldverschobenen $^3J = 3,6$ Hz zuordnen. Die Intensitäten der einzelnen Linienpaare (Hochfeld/Tieffeld) jedes Protons sind unterschiedlich. Da mit zunehmender Verringerung des Abstands der chemischen Verschiebung des anderen Methylenprotons die innen gelegenen Linien immer intensiver und die äußeren Linien immer schwächer werden, deutet das auf die Nähe der chemischen Verschiebung des anderen Methylenprotons hin.

Durch die Nachbarschaft zu dem chiralen Kohlenstoffatom der Methingruppe sind auch die Methylenprotonen der Hydroxymethylengruppe diastereotop und erscheinen als zentriertes Multiplett bei 3,88 ppm. Das Signal der Methingruppe zeigt sich durch die Substitution mit der elektronenziehenden Nitratgruppe stärker tieffeldverschoben (5,29 ppm) als das der Hydroxymethylengruppe (s. Kap. 2.2.3), da mit zunehmenden -I-Effekten der Substituenten die Abschirmung schwächer, die chemische Verschiebung daher größer wird.

Sowohl die Methingruppe als auch eine der Methylengruppen tragen jedoch einen Nitratsubstituenten, der eine Tieffeldverschiebung der Signale im Vergleich zur Hydroxymethylengruppe verursacht. Die stärkere Tieffeldverschiebung des Methinprotons ist damit zu erklären, daß in den Methylengruppen jeweils zwei Wasserstoffsubstituenten am Kohlenstoff vorhanden sind, welche sich elektropositiver auf die Elektronendichte auswirken als eine substituierte Alkylgruppe wie am Methinkohlenstoff. Die Folge ist eine größere Abschirmung der Methylen- im Vergleich zur Methingruppe, d.h. die chemische Verschiebung der Methylenprotonen wird kleiner. Der Ersatz eines Wasserstoffs durch eine Alkylgruppe am Methinkohlenstoff führt also zu einer weiteren Tieffeldverschiebung im Vergleich zur Nitrooxymethylgruppe, d.h. zu größeren σ -Werten. Sowohl das Signal der Methingruppe als auch das der Nitrooxymethylengruppe zeigen einen deutlichen „Dacheffekt“, der auf die gegenseitigen Kopplungen hinweist.

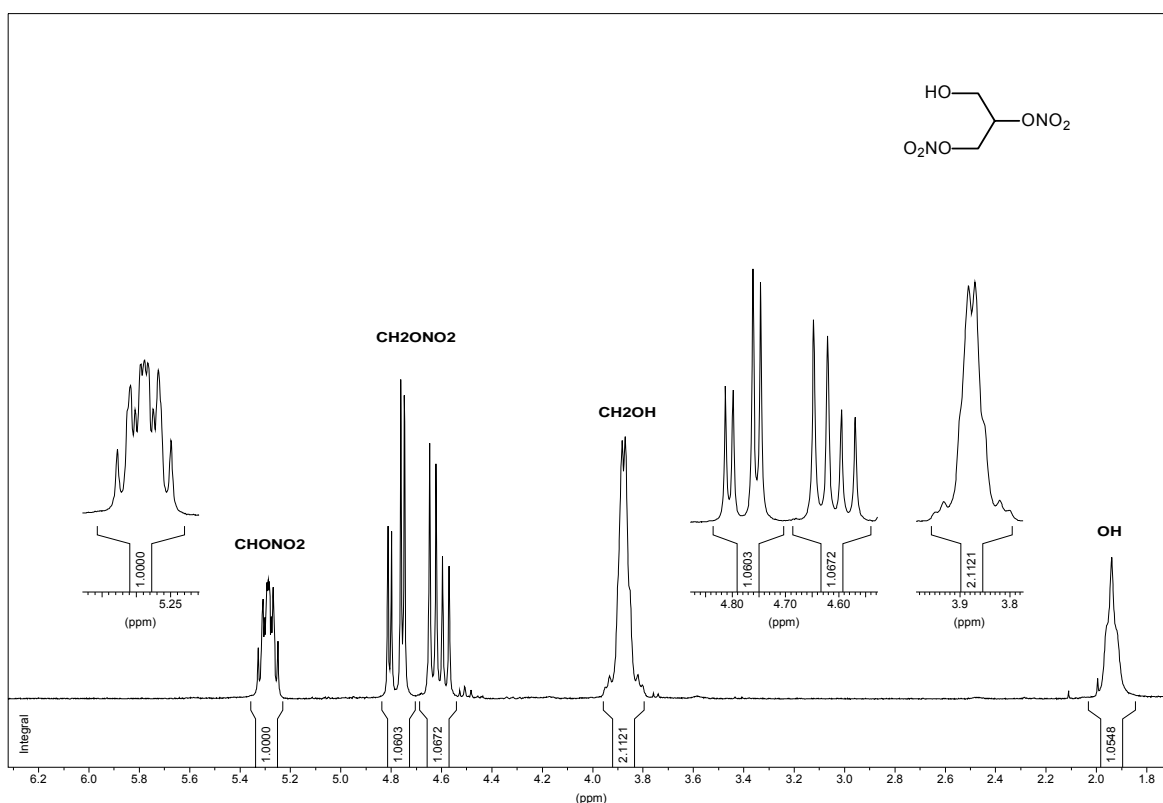


Abb. 2.97: ^1H -NMR von 1,2-GDN (CDCl_3) (10)

Als Nebenprodukt fiel in der Synthese von 1,2-GDN unerwartet GTN an, welches in einer Menge von 40 mg in den Hexanphasen isoliert wurde. Die Identität konnte mittels ^1H - und ^{13}C -NMR bestätigt werden. Das ^1H -NMR des GTN in CDCl_3 ist vergleichbar mit dem des 1,2-GDN jedoch fehlen die Signale der Hydroxymethylen- und Hydroxygruppe. Dafür ist das Integrationsverhältnis des Methinprotons zu den Methylenprotonen 1 zu 4 H. Im ^{13}C -NMR erhält man nur 2 Signale bei 74,55 ppm und 67,94 ppm, die dem Nitrooxymethin- bzw. den Nitrooxymethylenkohlenstoffen zugeordnet werden können.

2.2.7 Synthese von Glycerol-1,3-dinitrat (1,3-GDN) (11)

Die Herstellung des 1,3-GDN über direkte Nitrierung von Glycerol wurde bereits in Kap. 2.2.6 bei der Synthese von 1,2-GDN beschrieben. Weiterhin erhielten Ziakas *et al.* [2005] 1,3-GDN in 40%iger Ausbeute nach Umsetzung von Glycerol mit konz. Salpetersäure, Eisessig und Acetanhydrid unter Eiskühlung. Die Abtrennung der anderen Nitrierungsprodukte erwies sich jedoch in allen erwähnten Fällen als aufwendig.

Als weiteres Nitrierungsreagenz für Glycerol beschrieben Hakimelahi *et al.* [1984] Thionylchloridnitrat (**56**) (s. Kap. 2.2.1), welches auch zur Synthese von 1-GMN verwendet werden kann. Die Ausbeute an **11** wurde mit 70 % angegeben.

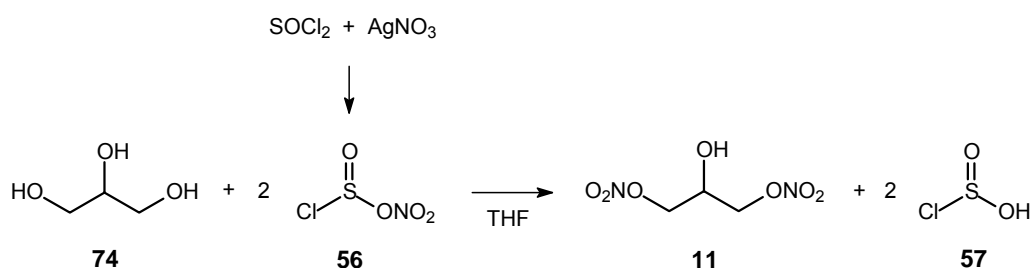


Abb. 2.98: Synthese von 1,3-GDN nach Hakimelahi *et al.* [1984]

Colclough *et al.* [2001] synthetisierten - ausgehend vom Glycidol - sowohl 1,2-GDN (s. Kap. 2.2.6) als auch 1,3-GDN unter Verwendung von Distickstoffpentoxid als Nitrierungsreagenz. Zur Synthese von 1,3-GDN wurde Glycidol zunächst mit Acetylchlorid in Dichlormethan unter Zusatz von Triethylamin bei 0°C umgesetzt und anschließend mit Distickstoffpentoxid in trockenem Dichlormethan bei 0°C nitriert. Die Acetylenschutzgruppe des so erhaltenen Dinitrats konnte im Folgenden mit Kaliumcarbonat in Methanol abgespalten werden. In allen drei Reaktionsschritten wurden jeweils Ausbeuten über 93 % erzielt.

Als vielversprechendste Methode zur Herstellung von 1,3-GDN erschien wie bei 1,2-GDN beschrieben (s. Kap. 2.2.6) die Umsetzung von 1,3-Dibrompropan-2-ol (**75**) mit Silbernitrat in Acetonitril in Anlehnung an Dunstan *et al.* [1965 a] und Shan *et al.* [2004]. Beide setzten die Bromverbindung und Silbernitrat in ähnlichem molaren Verhältnis von 2,4 - 2,8 zu eins in Acetonitril ein, wobei jedoch die Lösungsmittelmengen, die Reaktionsbedingungen und die Aufarbeitungsprozesse variierten. Beide Arbeitsgruppen erhielten 1,3-GDN als schwach gelbes Öl in ähnlich guten Ausbeuten (Dunstan *et al.*: 93,4 %; Shan *et al.*: 96 %).

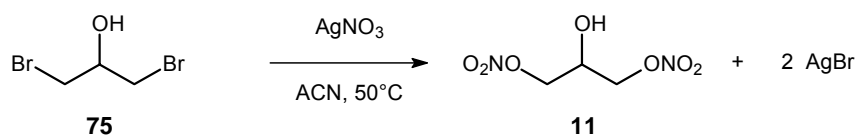


Abb. 2.99: Synthese von 1,3-GDN in Anlehnung an Shan *et al.* [2004] und Dunstan *et al.* [1965 a]

Für die Synthese von **11** im Rahmen dieser Arbeit wurde abweichend von diesen Methoden eine Reaktionstemperatur von 50°C gewählt. Dies sollte die Entstehung möglicher Nebenprodukte vermindern, jedoch verlängerte sich die Reaktionszeit auf sieben Tage. Wie bei Shan *et al.* [2004] wurde auch hier unter Lichtschutz gearbeitet. Die Umsatzkontrolle der Reaktion erfolgte mittels HPLC-Methode B. Das Edukt **75** konnte unter den gegebenen Bedingungen basisliniengetrennt vom Produkt **11** detektiert werden. Da jedoch nur qualitative Aussagen getroffen werden sollten, war eine bessere Trennung nicht erforderlich.

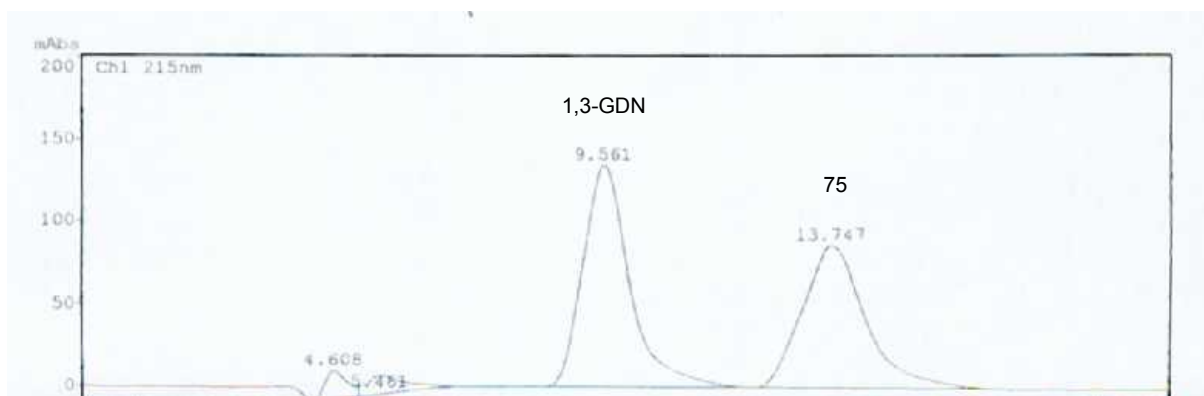


Abb. 2.100: Chromatogramm eines Gemisches aus **75** und 1,3-GDN (**11**) unter den Bedingungen der HPLC-Methode B

Die Aufarbeitung erfolgte in Anlehnung an Shan *et al.* [2004] unter Ausfällung der überschüssigen Silberionen allerdings mit Natriumchlorid anstelle von Natriumbromid und anschließender Extraktion des Filtrates. Als Extraktionsmittel wurde abweichend Chloroform gewählt. Auf diese Weise konnte **11** in 94%iger Ausbeute als schwach gelbes Öl ohne weitere Aufreinigung rein erhalten werden.

Im ^1H -NMR der Verbindung 1,3-GDN ist der entschirmende Einfluss der Nitratgruppen deutlich anhand der Tieffeldverschiebung der Signale der Methylengruppen zu erkennen (s. Kap. 2.2.3). Die Kohlenstoffatome der Methylengruppen können trotz fehlender Chiralität als „prochirale Zentren“ bezeichnet werden, da bei Austausch eines der beiden Wasserstoffatome gegen einen anderen Substituenten ein Chiralitätszentrum entstehen würde. Aufgrund der Symmetrie des Moleküls erscheinen die beiden Methylengruppen bei derselben chemischen Verschiebung.

Das Signal der Methingruppe erscheint aufgrund der Kopplung mit insgesamt fünf verschiedenen Protonen aus zwei Methylen- und einer Hydroxygruppe als Sextett, zentriert bei 4,30 ppm. Eine genaue Betrachtung des Sextetts zeigt eine geringe Linienverbreiterung auf, die eventuell eine Folge davon ist, daß keine Gleichartigkeit der Kopplungen zu den fünf Protonen vorliegt.

Die Hydroxygruppe erscheint infolge der Kopplung mit dem Methinproton erwartungsgemäß als Dublett, zentriert bei 2,57 ppm. Die vicinale Kopplungskonstante beträgt 5,2 Hz.

2.2.8 Synthese von Glycerol-1-mononitrat (1-GMN) (12)

Neben der mikrobiellen Herstellung von 1-GMN sind verschiedene synthetische Methoden aus der Literatur bekannt, die jedoch in den meisten Fällen nicht sehr zufriedenstellend verliefen.

Als Nebenprodukt der GDN-Herstellung aus Glycerin und Nitriersäure gelang Will [1908] schon Anfang des 20. Jahrhunderts die Gewinnung und Kristallisation von 1- und 2-GMN. Er beschreibt darüber hinaus, daß Hanriot schon 1879 die Synthese von 1-GMN durch Einwirkung von verdünnter Salpetersäure auf Glycidol (**76**) durchführte, eine Kristallisation der Substanz damals jedoch nicht gelang. Einen ähnlichen Syntheseweg mit rauchender Salpetersäure beschreiben Nichols *et al.* [1953], wobei sowohl Versuche im wässrigen Milieu als auch im nicht-wässrigen durchgeführt und einander gegenübergestellt wurden. Es konnte gezeigt werden, daß aus unsymmetrischen Epoxiden wie **76** in Abhängigkeit der Reaktionsbedingungen Gemische zweier verschiedener isomerer Produkte hervorgehen können. Die Herstellung von 1-GMN (**12**) aus **76** gelang Nichols *et al.* nach Extraktion und Destillation mit einer Ausbeute von 61 %, über die Entstehung des 2-Isomers **13** werden jedoch keine Angaben gemacht. In Anbetracht des ähnlichen Siedepunktes beider Isomeren zwischen 155 und 160 °C (15 mm) [Will, 1908] dürfte eine vollständige Trennung von **12** und **13** durch Destillation allerdings unwahrscheinlich gewesen sein.

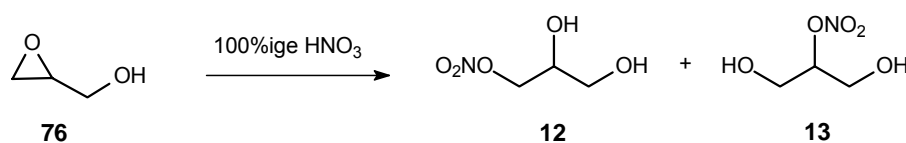


Abb. 2.102: Synthese von 1-GMN nach Nichols *et al.* [1953]

1-GMN kann desweiteren über partielle Nitrierung von Glycerol (**74**) gewonnen werden, jedoch ist die Reaktion schlecht steuerbar, da neben dem gewünschten Produkt auch 2-GMN, 1,2-GDN, 1,3-GDN und GTN entstehen können. Zur Nitrierung kann z.B. ein Gemisch aus konz. Schwefelsäure und 98%iger Salpersäure [Berthmann, 1963], aber auch Salpetersäure allein eingesetzt werden. Nach Abtrennung von Glyceroldi- und trinitraten können die beiden isomeren Mononitrate extrahiert und durch fraktionierte Kristallisation getrennt werden [Berthmann, 1963]. Wie bei Dunstan *et al.* [1965 b] beschrieben, ist die Aufreinigung langwierig und die Ausbeute von 1% gering.

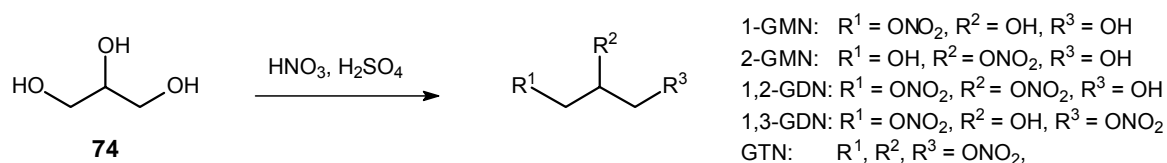


Abb. 2.103: Synthese von 1-GMN durch direkte Nitrierung von Glycerol nach Berthmann *et al.* [1963]

Höhere Ausbeuten von 92 % konnten von Tamami *et al.* [2004] erhalten werden. Auch er setzte **76** ein, verwendete jedoch im Unterschied zu Hanriot (s.v.) und Nichols [1953] für die Ringöffnungsreaktionen an stark basisches Austauschharz (Amberlite IRA-400) gebundenes Nitrat (**77**). Der Vorteil dieser Methode liegt sowohl in der einfachen Durchführung unter neutralen Bedingungen als auch der leichten Isolierbarkeit des Endproduktes, der Abwesenheit jedweder Katalysatoren, den hohen Ausbeuten und der Regenerierbarkeit der Polymermatrix.

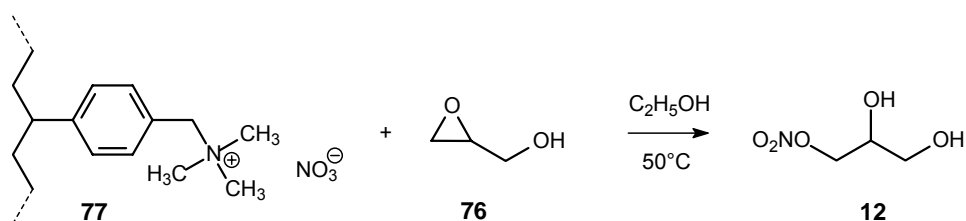


Abb. 2.104: Synthese von 1-GMN nach Tamami *et al.* [2004]

Auch Allylalkohol **78** ist als Ausgangsprodukt für die Synthese von 1-GMN bekannt. Diese erfolgte, wie von Eremenko *et al.* [1967, 1970] beschrieben, zunächst durch Umsetzung von Allylalkohol mit 100%iger Salpetersäure und Acetanhydrid bei 0°C zu Allylnitrat (**79**) und anschließender modifizierter Wagner Oxidation durch cis-Hydroxylierung der Doppelbindung mit Kaliumpermanganatlösung bei -20°C in einer Aceton-Wasser-Mischung (**80**). Die Ausbeute an **12** betrug nur 15,2 %.

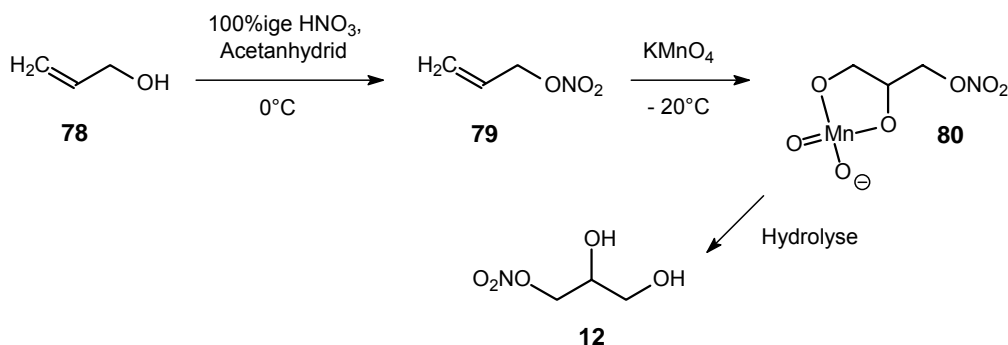


Abb. 2.105: Synthese von 1-GMN (**12**) nach Eremenko et al. [1967 und 1970]

Wie in Kap. 2.2.1 bereits erwähnt, beschrieben Hakimelahi *et al.* [1984] die Synthese von 1-GMN mit Thionylchlorid und Silbernitrat in THF mit 65%iger Ausbeute.

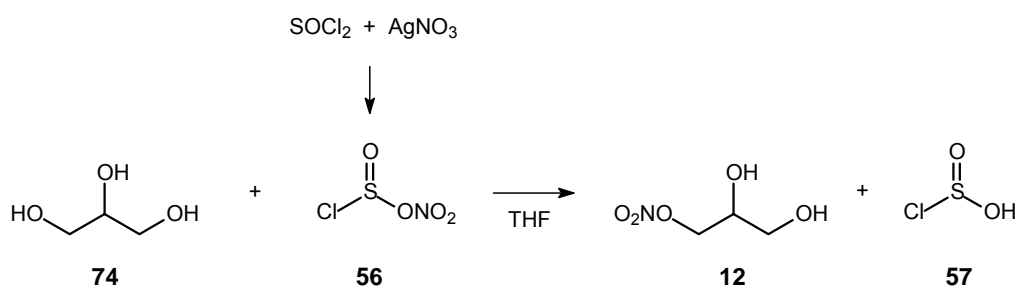


Abb. 2.106: Synthese von 1-GMN (**12**) nach Hakimelahi et al. [1984]

Eine erfolgreiche Darstellung von **12** gelang, in Anlehnung an die Synthese des PEMN sowie 1,2-GDN (s. Kap. 2.2.5), durch Umsetzung von 3-Brom-1,2-propandiol (**81**) mit Silbernitrat in trockenem Acetonitril bei 70°C:

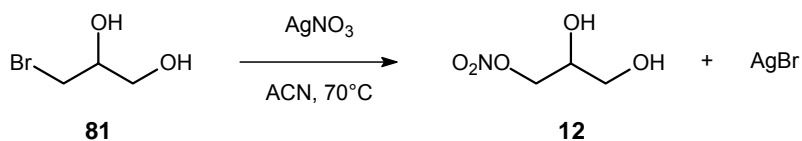


Abb. 2.107: Synthese von 1-GMN (**12**) in Anlehnung an Dunstan et al. [1965b]

Von Nachteil waren lediglich die lange Reaktionszeit von zehn Tagen und die problematische Umsatzkontrolle, da Edukt und Produkt sich in ihren Eigenschaften kaum unterscheiden und mit den etablierten HPLC-Methoden nicht getrennt werden konnten. Auch eine DC-Analytik bot sich infolge der ähnlichen R_F-Werte nicht an. Eine Abschätzung des Reaktionsverlaufes konnte jedoch über die Menge an ausgefallenem Silberbromid getroffen werden, wobei allerdings kein 100%iger Umsatz erreicht werden konnte. Nach Ausfällung und Abtrennung der überschüssigen Silberionen und Aufarbeitung mittels der

für PEMN entwickelten Methode der fraktionierten Extraktion (s. Kap. 2.2.5) konnte **12** als schwach gelbes Öl gewonnen werden. Eine Kristallisation gelang leider im Gegensatz zu Will [1908] und Dunstan [1965 *b*] bisher nicht. Will [1908] erklärt die schwierige Kristallisation als Folge geringer Verunreinigungen, die wegen der großen Löslichkeit in polaren Lösungsmitteln nur schwer vollständig entfernt werden können.

Wie im ^1H -NMR ersichtlich, gelang es nicht, 1-GMN in völlig reiner Form zu gewinnen, sondern nur im Gemisch mit geringen Mengen 2-GMN (s. Kap. 2.2.9).

Das Aufspaltungsmuster des Signals der benachbart zur Nitratgruppe befindlichen, diastereotopen Methylenprotonen in zwei Doppeldoublets bei 4,36 - 4,43 ppm und 4,56 - 4,62 ppm ist analog dem der Nitrooxymethylenprotonen von 1,2-GDN (s. Kap. 2.2.6).

Das Methinproton erscheint aufgrund des geringeren $-I$ -Effektes der Hydroxygruppe dazu hochfeldverschoben bei 3,74 ppm als zentriertes Multiplett.

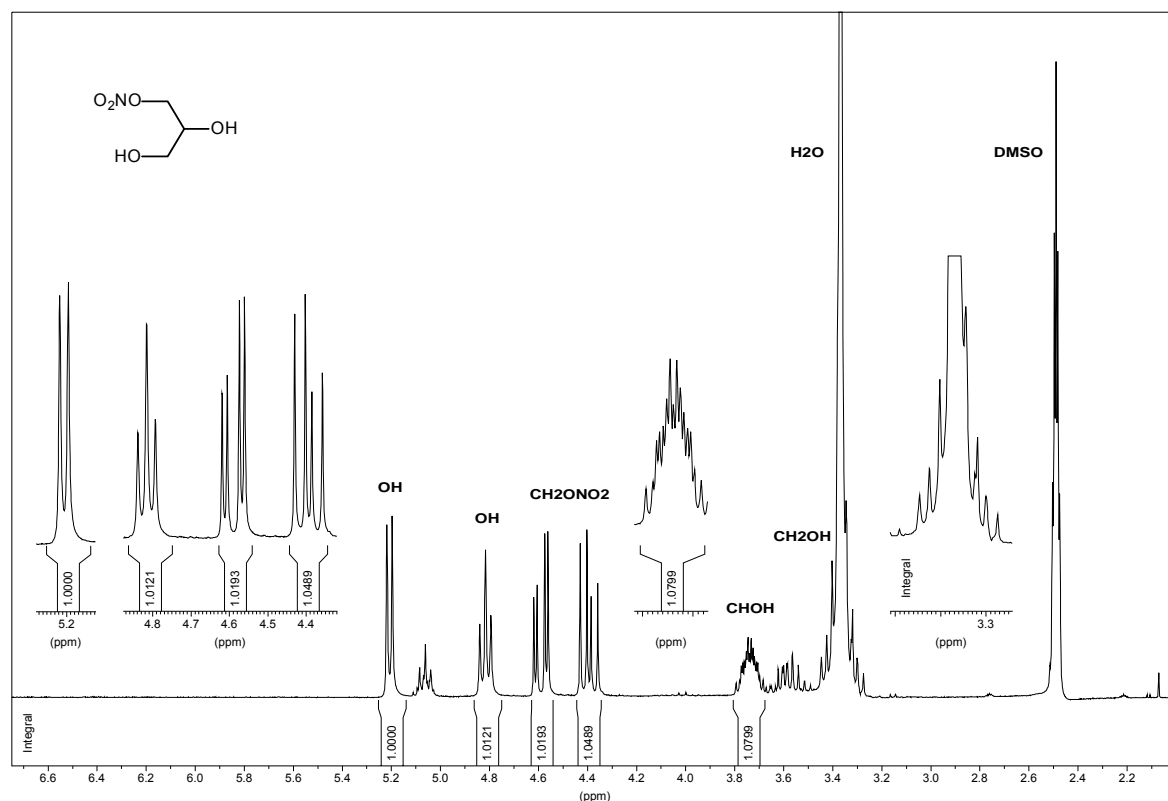


Abb. 2.108: ^1H -NMR von 1-GMN ($[\text{D}_6]$ -DMSO) (**12**)

Am weitesten im Hochfeld ist das Signal der Hydroxymethylengruppe bei 3,28 – 3,44 ppm zu finden. Im ^1H -NMR von **12** ist dieses Signal jedoch vom Singulett des Wassers überlagert, so daß ein D_2O -Austauschspektrum angefertigt werden mußte um die Zuordnung und Integration des Signals zu bestätigen. Durch die Nachbarschaft des chiralen Zentrums sind die beiden geminalen Protonen ebenfalls diastereotop, treten daher bei geringfügig unterschiedlichen Frequenzen in Resonanz und zeigen

verschiedene chemischen Verschiebungen. Im D_2O -Austauschspektrum in Abb. 2.109 ist deutlich die Aufspaltung in zwei Doppeldoublets zu erkennen. Mit Hilfe dieses Spektrum konnte auch die Zuordnung der Signale der OH-Protonen bewiesen werden, welche in Abb. 2.108 bei 4,82 ppm und 5,21 ppm zentriert sind. Durch Nachbarschaft zu zwei Methylenprotonen erscheint das OH-Signal der Hydroxymethylengruppe als Triplett mit einer vicinalen Kopplungskonstante von $^3J = 5,7$ Hz, während aus der alleinigen Kopplung mit dem Methinproton für das OH-Proton am Methinkohlenstoff ein Doublet mit einer vicinalen Kopplungskonstante von $^3J = 5,4$ Hz resultiert.

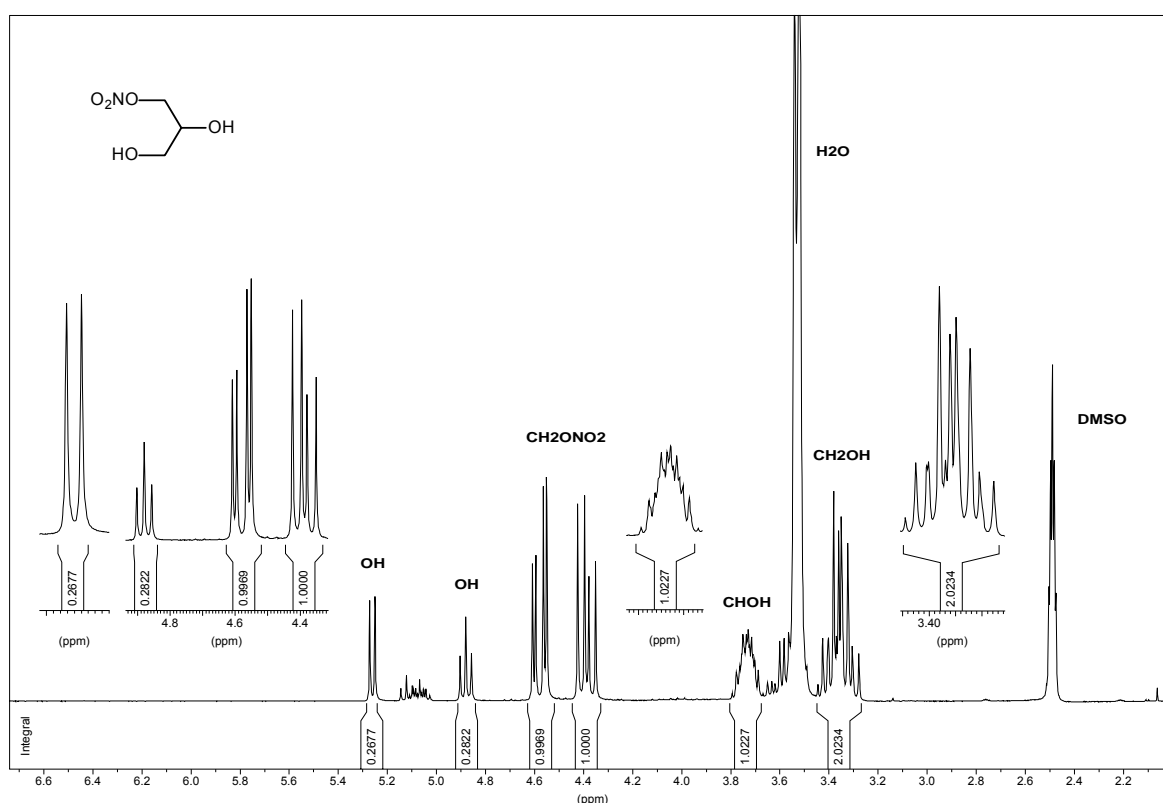


Abb. 2.109: D_2O -Austauschspektrum von 1-GMN ($[D_6]$ -DMSO + D_2O) (12)

2.2.9 Synthese von Glycerol-2-mononitrat (2-GMN) (13)

Neben der (im Rahmen dieser Arbeit nicht bedeutsamen) mikrobiellen Herstellung aus GTN [Ducrocq, 1989 a,b, 1990; Wimmer, 1991] finden sich in der Literatur nur wenige Darstellungswege für 2-GMN.

Die direkte Nitrierung ist, wie schon bei 1-GMN und PEMN (s. Kap. 2.2.8 und 2.2.5), nicht selektiv und daher nur in geringen Ausbeuten durchzuführen [Will, 1908; Berthmann, 1963; Dunstan, 1965 b]. Es wurden daher verschiedene Synthesestrategien entwickelt:

(1) Da das Edukt für 2-GMN in Anlehnung an Dunstan *et al.* [1965 b] nicht käuflich zu erwerben war, sollte versucht werden, 2-Brom-1,3-propandiol bzw. die entsprechende Chlorverbindung auf synthetischem Wege herzustellen.

Wohl *et al.* [1899] und Read *et al.* [1922] synthetisierten die Bromverbindung durch Einwirkung von unterbromiger Säure bzw. Brom auf Allylalkohol.

Für die Darstellung des Chlorderivats bot sich, zunächst der Synthesestrategie Ilczuks [Ilczuk, 1978] folgend, die Acetylierung von 1,3-Dichlor-2-propanol (**82**) und anschließende Umsetzung mit Thionylchlorid (**84**) an. Nach Abspaltung der Acetylreste sollte **85** in Anlehnung an Dunstan *et al.* [1965 b] und Shan *et al.* [2004] mit Silbernitrat in Acetonitril in 1-GMN überführt werden. Zur Steigerung der Reaktionsfähigkeit von **85** wäre eine Finkelstein-Reaktion mit NaI oder KI in Aceton [Elrick, 1954; Chopin, 2005] denkbar gewesen (s. Kap. 2.2.4).

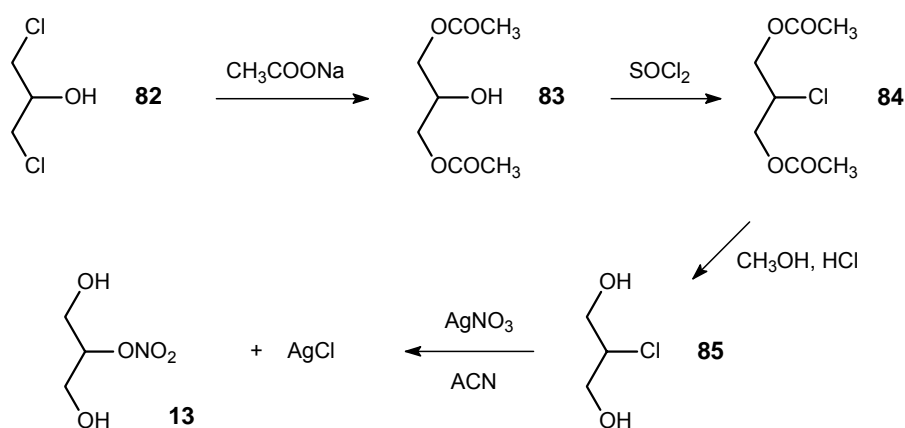


Abb. 2.110: Synthesepfad für 2-GMN ausgehend von Ilczuk [1978]

Dieser Synthesepfad scheiterte jedoch schon bei der Acetylierung von **82** nach Ilczuk [1978]. Nach Umsetzung der flüssigen Chlorverbindung **82** mit Natriumacetat unter Rühren und Erhitzen konnte kein Stoffumsatz festgestellt werden. In analoger Weise wurde auch mit der 1,3-Dibrom-Verbindung verfahren, auch hier zeigte sich nicht die erwartete Reaktion. Daraufhin wurde Natriumacetat durch Silberacetat ersetzt und Eisessig als Lösungsmittel verwendet. Das entstehende Silberchlorid bzw. -bromid sollte als schwerlösliche Verbindung ausfallen und die Reaktion in Richtung der Produkte verschieben. Bei dieser Synthese entstanden jedoch nur Substanzgemische aus Monoacetat, Diacetat und sogar Triacetat neben anderen Verbindungen, deren Massen im GC/MS nicht zugeordnet werden konnten. Daraufhin wurde diese Synthesestrategie verworfen.

(2) Die Darstellung von 2-GMN (**13**) gelang schließlich ausgehend von einem Verfahren nach Bentley und McCrae [Bentley, 1970] zur Synthese symmetrischer 1,3-Diglyceride.

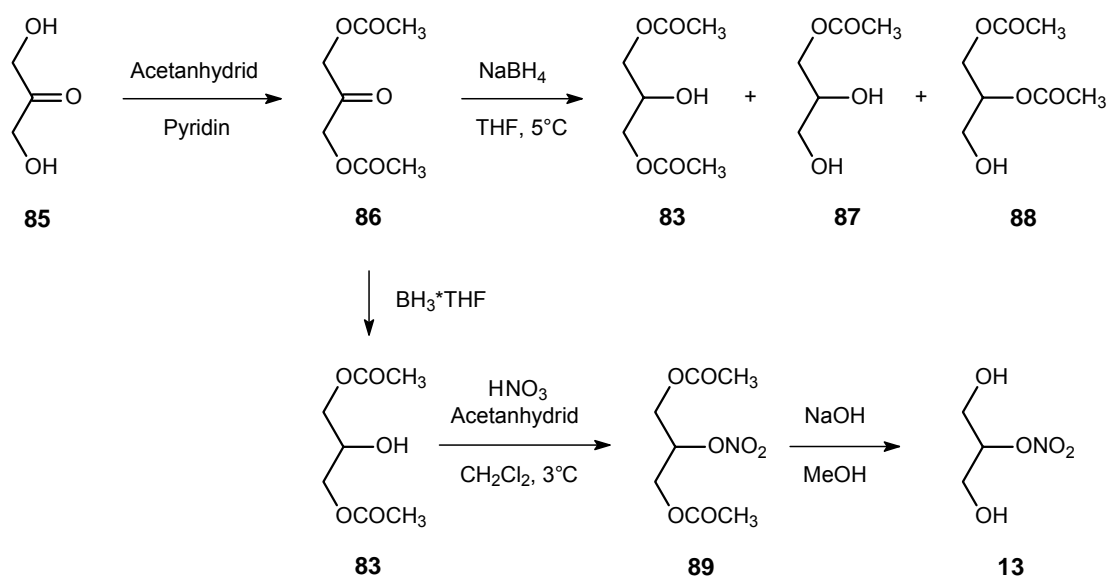


Abb. 2.111: Syntheschema zur Darstellung 2-GMN (**13**)

1,3-Dihydroxyaceton (**85**) wurde demgemäß mit Acetanhydrid in Pyridin zu 1,3-Diacetoxyaceton (**86**) acetyliert, was im ¹H- bzw. ¹³C-NMR deutlich am Signal der Methylgruppen bei 2,16 ppm bzw. 20,31 ppm zu erkennen ist (s. Abb. 2.112).

Die Ketogruppe des entstandenen Diacetats **86** sollte anschließend mit Natriumborhydrid in THF/H₂O bei 5°C zum Alkohol **83** reduziert werden. Bentley *et al.* [1970] weisen jedoch darauf hin, daß die Reduktion bei langkettigen 1,3-Diglyceriden reibungslos und schnell verläuft, während bei den kurzkettigen Verbindungen auch das 1,2-Isomer entstehen würde. Anhand von GC/MS-Analysen (Methode B) war ersichtlich, daß das Keton zwar vollständig reduziert wurde, aber immer Mischungen aus einfach und zweifach acetylierten Verbindungen (**83**, **87**, **88**) entstanden - erkennbar im ¹H-NMR an einem der CH₂OH-Gruppe entsprechenden Dubett bei 3,72 ppm. Alle Modifikationen der Versuchsbedingungen, in denen z.B. die Menge an zugesetztem Eisessig verändert, der Wasserzusatz weggelassen oder die Menge an Natriumborhydrid und die Reaktionszeit reduziert wurde, führten dennoch zur Deacetylierung einer Hydroxygruppe.

Die Ursache könnte das Auftreten eines alkalischen Milieus zum Ende der Reaktion sein. Schenker [1961] erkannte, daß die Menge des verwendeten Alkaliborhydrids den pH-Wert der Reaktionslösung verändert und mit steigendem pH-Wert gewisse Nebenreaktionen wie Deacetylierungen auftreten können. Besonders bei einem Überschuß an Natriumborhydrid wurden solche Reaktionen beobachtet.

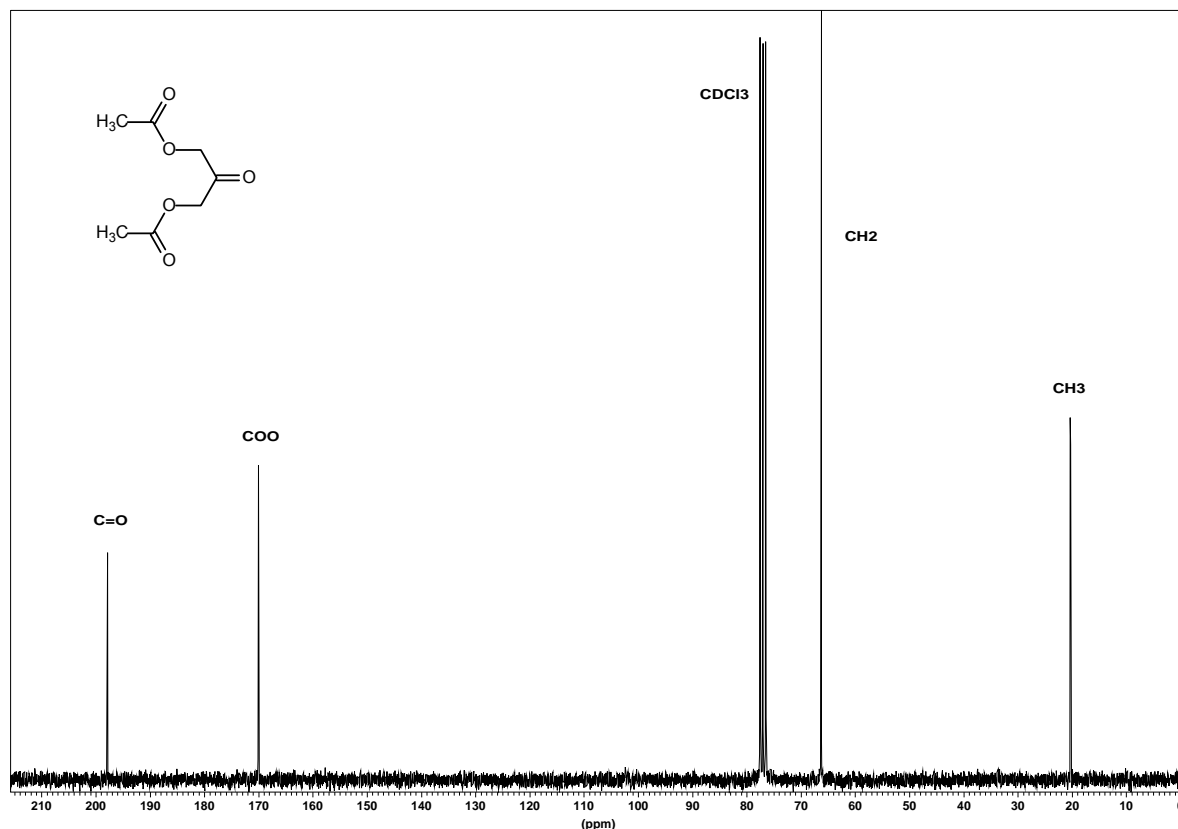


Abb. 2.112: ¹³C-NMR von 1,3-Diacetoxyacetone (CDCl₃) (**86**)

Eine andere Methode zur Reduktion des Ketons **86** zu **83** wurde schließlich in BH₃*THF gefunden. Die Reaktion in THF bei 3°C verlief problemlos in Ausbeuten von 45 %. Zur Umsatzkontrolle wurde GC/MS-Methode B verwendet (s. Abb. 2.113).

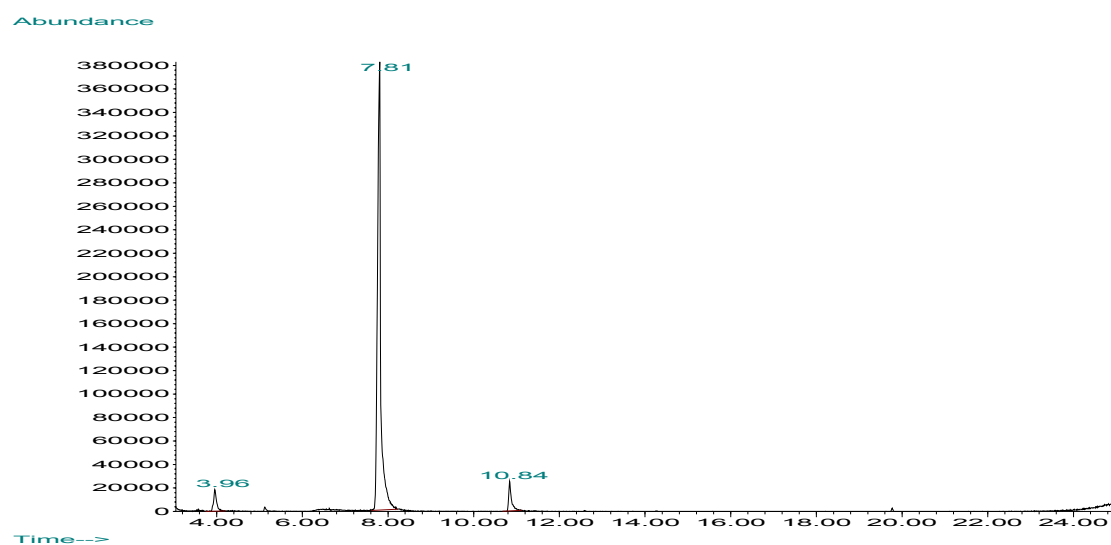


Abb. 2.113: Chromatogramm der Umsetzung von **86** mit BH₃*THF

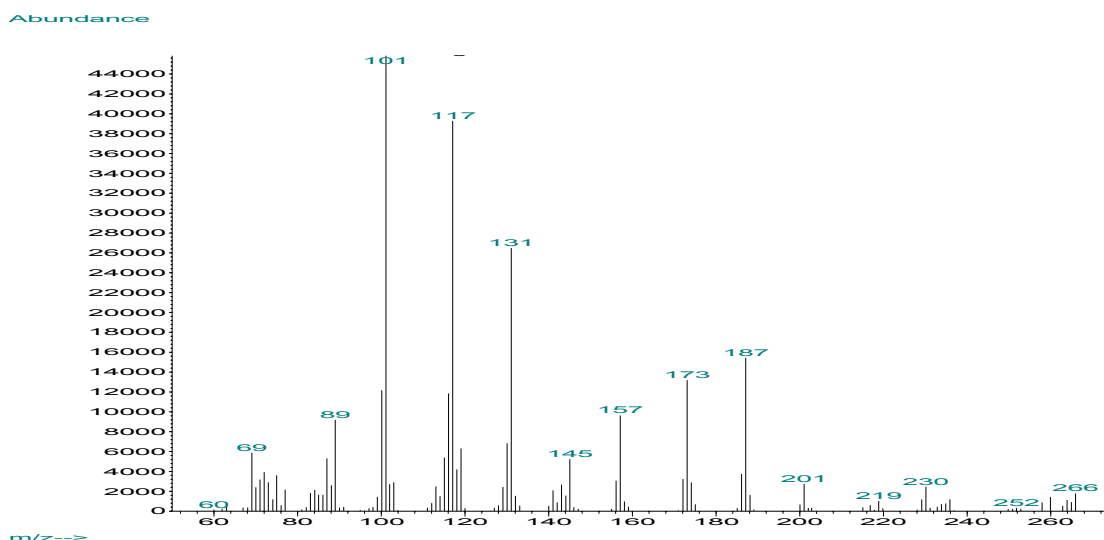


Abb. 2.114: Massenspektrum eines Zwischenprodukts der Umsetzung von **86** mit 1M-BH₃*THF

Der gefundene Produktpeak (s. Abb. 2.113 und 2.114) mit $m/z = 266$ stimmt allerdings nicht mit der erwarteten Masse von $m/z = 176$ überein. Es könnte sich dabei um ein Borsäure-Addukt handeln auch wenn die Masse nicht exakt einer bestimmten Verbindung zugeordnet werden konnte.

Dieses Addukt ist nach dem Aufreinigungsprozeß im GC/MS jedoch nicht mehr feststellbar. Einzig das farblose, ölige Glycerol-1,3-diacetat (**83**) war bei 6,2 min Retentionszeit zu erkennen. Die Identität konnte mittels ¹H- und ¹³C-NMR bestätigt werden.

Die Ketofunktion des Eduktes 1,3-Diacetoxyaceton (**86**) erscheint im ¹³C-NMR bei 197,88 ppm - deutlich ist im Vergleich dazu das Fehlen eines entsprechenden Signals beim Produkt **83** zu erkennen (s. Abb. 2.115). Beide Acetylreste sind noch intakt, ersichtlich am Signal der Methylgruppen bei 20,71 ppm und der Estergruppe bei 171,06 ppm, ein zusätzliches Signal der Hydroxymethylengruppen von 1,3-Dihydroxyaceton (**85**) ist nicht vorhanden.

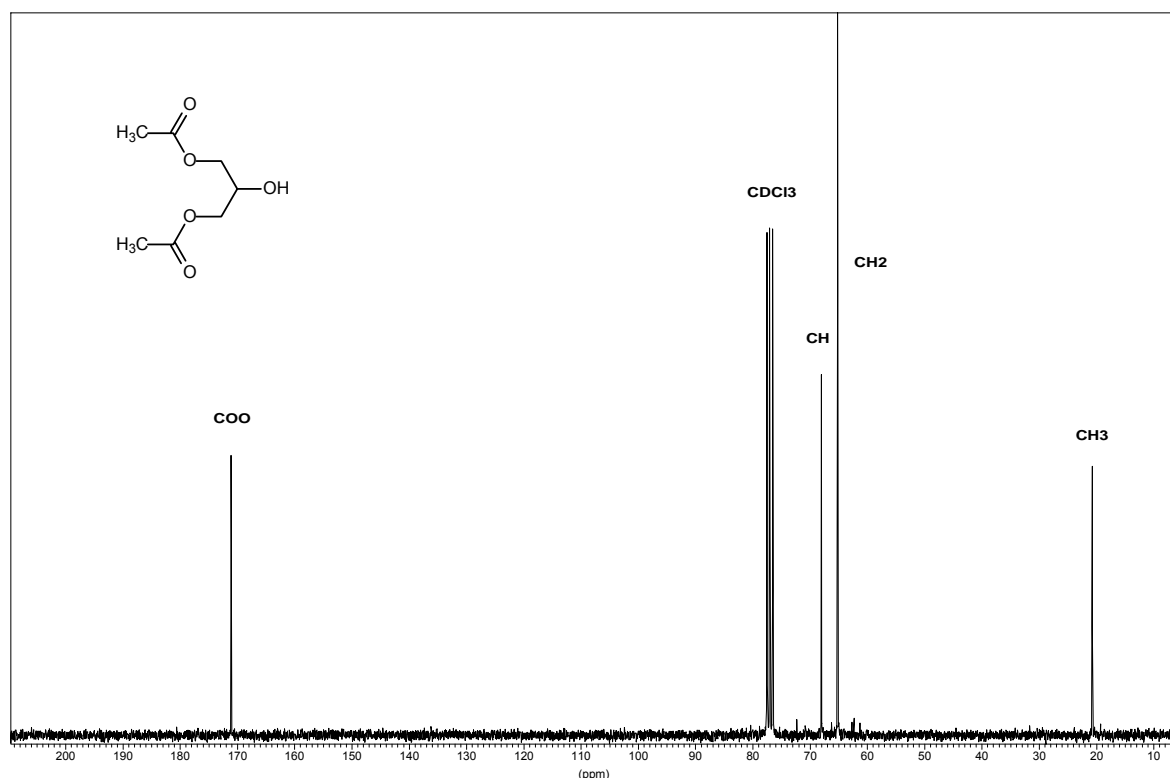


Abb. 2.115: ^{13}C -NMR von Glycerol-1,3-diacetat (CDCl_3) (**83**)

Im nächsten Schritt wurde **83** mit einem Gemisch aus rauchender Salpetersäure und Acetanhydrid in Dichlormethan in die Nitratverbindung überführt. Dem auf 3°C gekühlten Ansatz wurde vor der Nitrierung noch Harnstoff zugesetzt um die bei der Reaktion entstehende salpetrige Säure zu zerstören. Nach problemloser Aufarbeitung konnte **89** als farbloses Öl in 96%iger Ausbeute erhalten werden.

Aufgrund der Symmetrie des Moleküls zeigen die Signale beider Methylengruppen im ^1H -NMR-Spektrum von **89** dieselbe chemische Verschiebung. Die folgende Auswertung bezieht sich daher nur auf die Betrachtung einer der beiden Methylengruppen, gilt allerdings genauso für die andere. Die geminalen H-Atome der jeweiligen Methylengruppen sind untereinander nicht identisch (s. Kap. 2.2.6) und koppeln miteinander mit der größten der insgesamt drei Kopplungskonstanten (12,4 Hz). Jedes der H-Atome koppelt ferner mit dem Methinproton, wobei die Kopplungskonstanten verschieden sind. Die größere beträgt 6,2 Hz und die kleinere 3,8 Hz, woraus sich als Signal für die Methylenprotonen jeweils ein Dublett vom Dublett ergibt. Das am weitesten hochfeldverschobene Linienpaar des einen Methylenprotons (4,19 und 4,22 ppm) ebenso wie das Linienpaar bei tieferem Feld sind fast intensitätsgleich, was daraufhin deutet, daß die chemische Verschiebung des Kopplungspartners, nämlich des Methinprotons, weit entfernt liegt (5,44 ppm) (s. auch Kap. 2.2.6, 2.2.7).

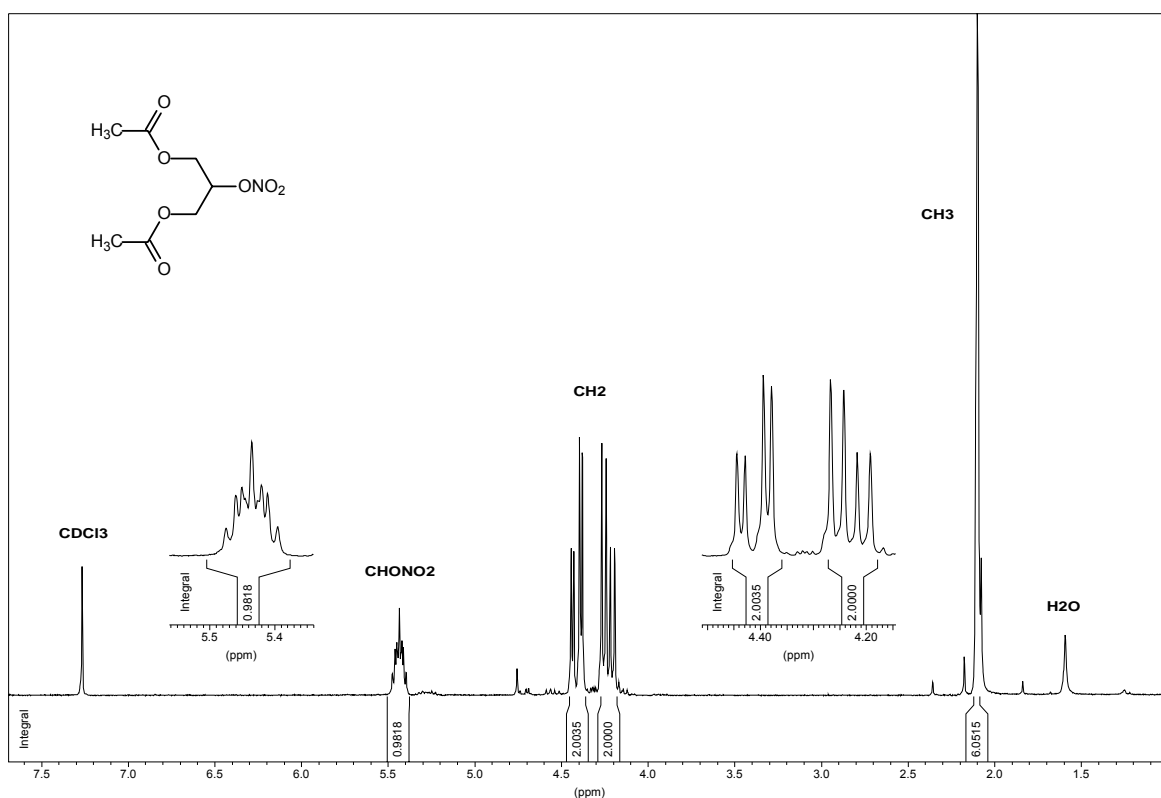


Abb. 2.116: ^1H -NMR von Glycerol-2-mononitrat-1,3-diacetat (CDCl_3) (**89**)

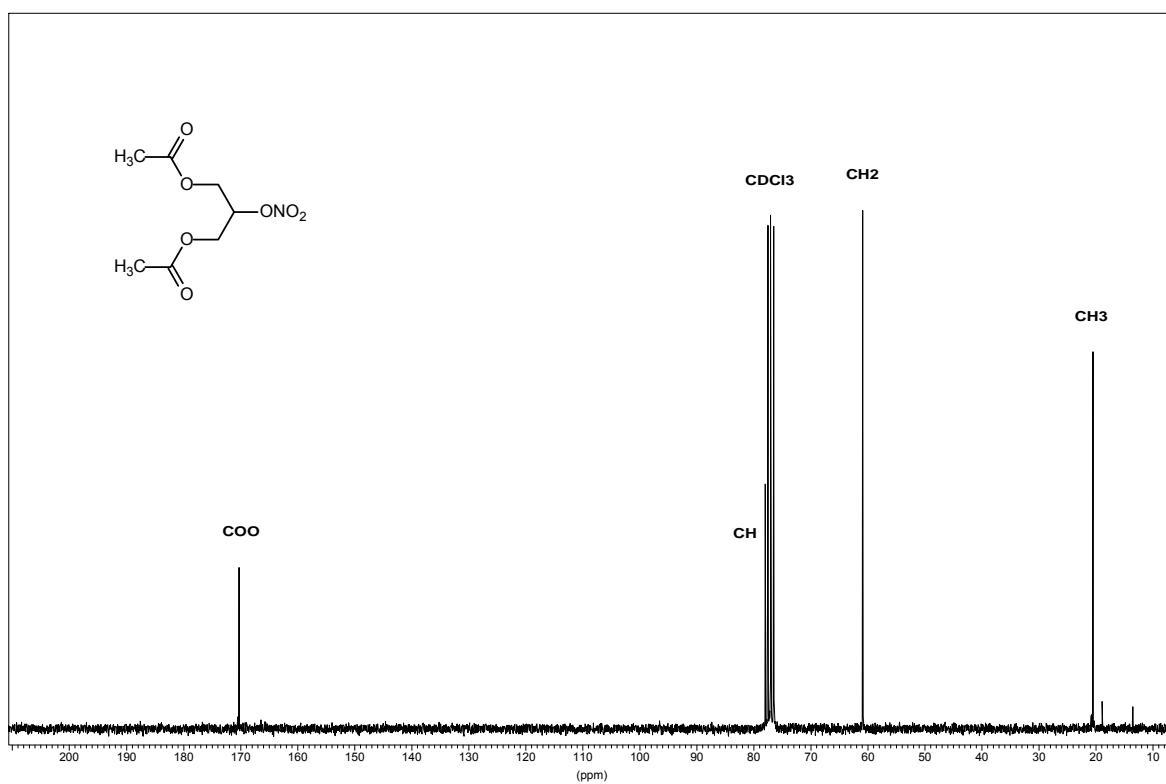


Abb. 2.117: ^{13}C -NMR von Glycerol-2-mononitrat-1,3-diacetat (CDCl_3) (**89**)

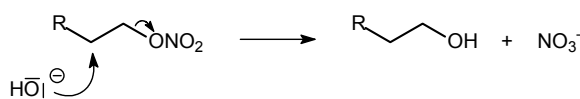
Die Intensität des Hochfeldlinienpaars ist jedoch deutlich kleiner als diejenige des bei tieferem Feld liegenden Paars. Darin kommt die Nähe der chemischen Verschiebung des anderen Methylenprotons zum Ausdruck. Die Störung der Intensitäten der Signale wird nämlich immer größer, je näher die chemischen Verschiebungen der Signale zusammenrücken. Das Signal der Methingruppe erscheint im Vergleich zu dem der Methylengruppen aufgrund des abschirmenden Einflusses der benachbarten Nitratgruppe (s. Kap. 2.2.3) deutlich tieffeldverschoben als zentriertes Multiplett. Auch im ^{13}C -NMR ist die Tieffeldverschiebung erkennbar.

Die Protonen der beiden Methylgruppen sind chemisch und magnetisch äquivalent (homotop) und ergeben daher im Spektrum aufgrund fehlender Kopplungen zu weiteren Protonen ein Singulett bei 2,10 ppm.

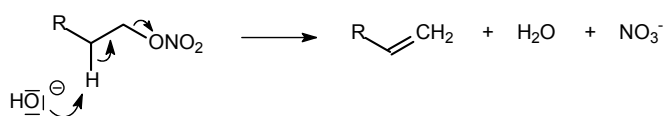
Im letzten Reaktionsschritt erfolgte die Abspaltung der Acetylgruppen von **89** mit Natriumhydroxid-Lösung in Methanol. Aus der Aufarbeitung resultierte **13** als schwach gelbes Öl, welches nach NMR-Analyse zu etwas unter 30% mit dem 1-Isomer **12** verunreinigt war. Durch eine Verkürzung der Reaktionszeit von 12 auf 6 min ließ sich die Ausbeute an **13** im Verhältnis zu **12** geringfügig erhöhen. Eine Kristallisation der Substanz gelang bisher nicht.

Die basische Hydrolyse organischer Nitrats wurde schon früher untersucht u.a. von Baker *et al.* [1950, 1952] und Cristol *et al.* [1955]. Dabei wurden drei mögliche Reaktionsmechanismen herausgestellt: die nucleophile Substitution ($\text{S}_{\text{N}}2$) zu Alkohol und anorganischem Nitrat, β -Wasserstoff-Eliminierung zu Olefin und Nitrat sowie α -Wasserstoff-Eliminierung zu Aldehyd und Nitrit (s. Abb 2.118).

a.) nucleophile Substitution:



b.) β -Eliminierung zum Olefin:



c.) α -Eliminierung zum Aldehyd:

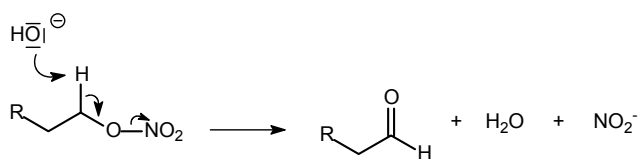


Abb. 2.118: Reaktionsmechanismen für die basische Hydrolyse von organischen Nitraten

Aufgrund des Vorhandenseins von mehreren Hydroxylgruppen im Molekül der Glycerolmononitrate und damit möglicher intramolekularer Interaktionen bzw. Hydrolyseprozesse zwischen den benachbarten O^- und ONO_2 -Gruppen sind zusätzliche Reaktionen wie Isomerisierungen denkbar. Die Beobachtung, daß bei der basischen Hydrolyse von Glycerolmononitraten eine Isomerisierung der Nitratgruppe von der C2-Position zur C1-Position stattfindet, wurde schon 1982 von Capellos *et al.* [1982] beschrieben. 2-GMN (**13**) isomerisierte dabei in alkalischen Lösungen von $\text{Ca}(\text{OH})_2$ zunächst zu 1-GMN (**12**) bzw. **91**, welches weiter zu Nitrat, Nitrit und im NaOH-Alkalischen auch zu Glycidol **76** hydrolysierte. Der Ablauf der Isomerisierung bzw. Hydrolyse wurde wie folgt spekuliert:

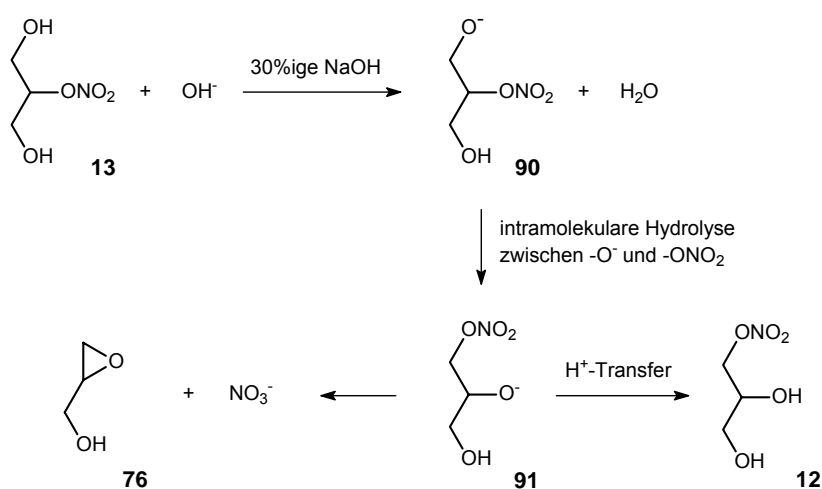


Abb. 2.119: Isomerisierung von 2-GMN zu 1-GMN und weitere Hydrolyse zu Glycidol und Nitrat

Die Ursache für diese Prozesse sahen Capellos *et al.* in der höheren Stabilität der Nitratgruppe in der C1-Position im Vergleich zur C2-Position. Für 1,2-GDN wurde ebenfalls eine Isomerisierung zu 1,3-GDN beobachtet [Capellos, 1984].

Beide Methylengruppen sind im ^1H -NMR von **13** zu einem Multiplett bei 3,49 – 3,67 ppm überlagert. Wie schon bei **89** beschrieben, sind die geminalen Wasserstoffatome der Methylengruppen untereinander nicht äquivalent und kommen bei unterschiedlichen Frequenzen zur Resonanz. Die Folge ist ein überlagertes Multiplett aus Doppeldoublets. Die Angabe exakter Kopplungskonstanten ist in diesem Falle nicht möglich, da infolge der Überlagerung eine Linienverbreiterung der Signale festzustellen ist.

Die zur Nitratgruppe benachbarte Methingruppe von **13** erscheint wie schon bei **89** tieffeldverschoben bei 5,02 – 5,11 ppm als zentriertes Multiplett. Dieses Signal fällt jedoch mit dem Signal der Hydroxygruppen zusammen, was anhand der Integration von insgesamt 3 H sowie durch ein D_2O -Austauschspektrum bewiesen werden konnte.

Die Hydroxylprotonen erscheinen durch Kopplung mit den zwei jeweils benachbarten Methylenprotonen erwartungsgemäß als Triplet bei 5,05 ppm.

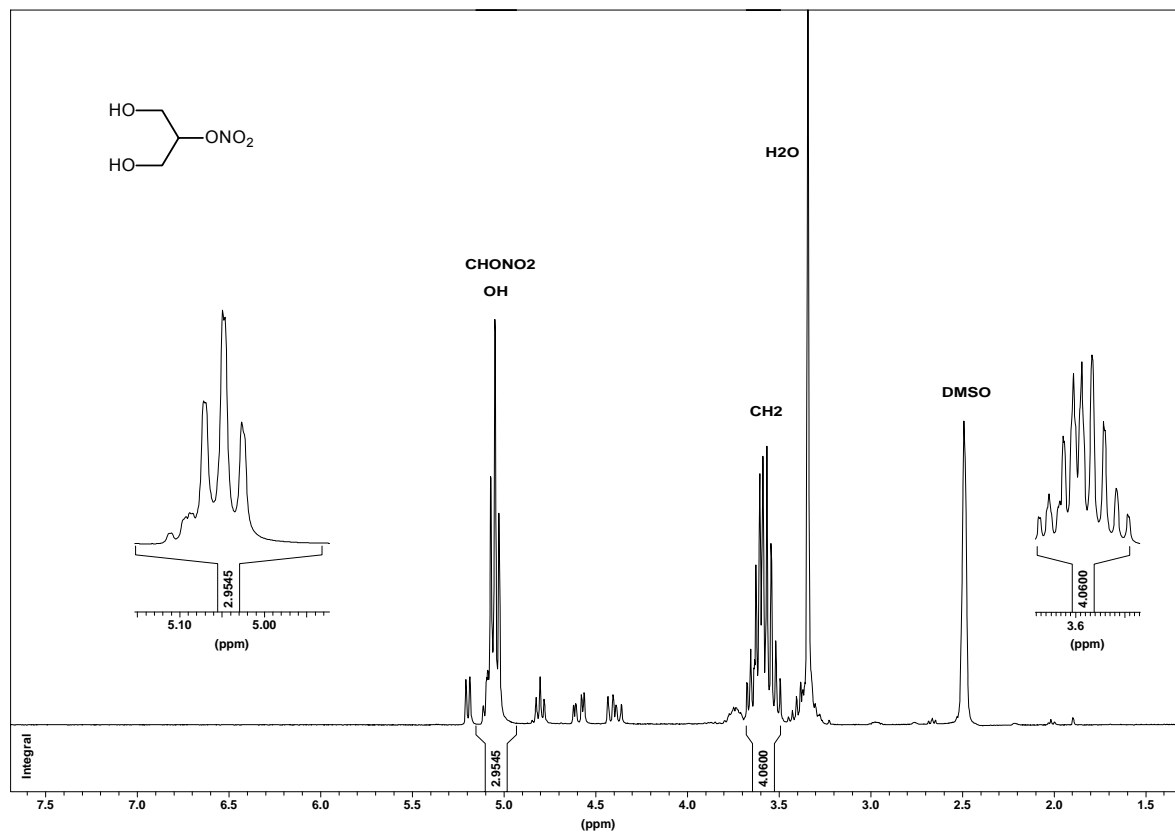


Abb. 2.120: ^1H -NMR von 1-GMN ($[\text{D}_6]$ -DMSO) (13)

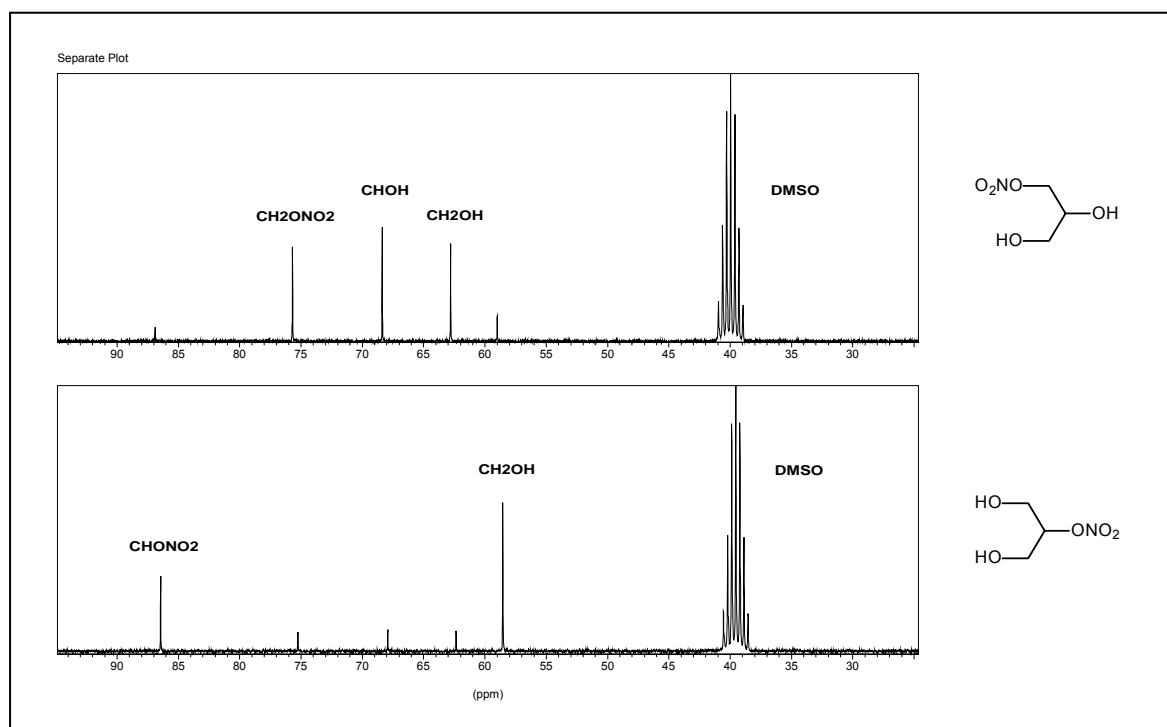


Abb. 2.121: Vergleich der ^{13}C -NMR-Spektren von 1-GMN (12) und 2-GMN (13) ($[\text{D}_6]$ -DMSO)

Neben den Signalen von **13** sind im ^1H -NMR die Signale des 1-GMN (**12**) bei 3,28 – 3,42 ppm, 3,74 ppm, 4,35 – 4,84 ppm und 5,20 ppm erkennbar.

Versuche zur Trennung der Isomeren waren bisher leider nicht erfolgreich.

Die ^{13}C -NMR-Spektren von **12** und **13** sind in Abb. 2.121 einander gegenübergestellt. Die Identität der Verunreinigung konnte hiermit eindeutig bestätigt werden.

2.3 Synthese bifunktionaler NSAID-Organonitrat-Hybridverbindungen

2.3.1 Syntheseveruche zur Darstellung von Flurbiprofen-Organonitrat-Hybridverbindungen aus bromierten Vorstufen

Die Synthese von NSAID-Organonitrat-Hybridsubstanzen bestehend aus Flurbiprofen und einem PETN-Metaboliten kann, wie zur Darstellung von 1,2-GDN (s. Kap. 2.2.6) beschrieben, durch Umsetzung der entsprechenden Bromverbindungen mit Silbernitrat erfolgen, was für aliphatische Nitraterester z.B. von Glycerol bereits angewendet wurde [Lolli, 2001; Ingram, 2001; Del Soldato, 2003]. Die Reaktionen werden jeweils in homogener Phase in trockenem Acetonitril durchgeführt, was im Vergleich zur Arbeit in heterogener Phase Vorteile bietet (s. Kap. 2.2.1).

2.3.1.1 Synthese der bromierten Ausgangsstoffe

Eine Darstellung der bromhaltigen Ausgangsstoffe gelingt z.B. durch Umsetzung des entsprechenden Halogenalkanols mit dem Säurechlorid des jeweiligen NSAIDs unter Zusatz einer Base [Lolli, 2001] oder durch Reaktion von Dihalogenenalkanen mit dem Natriumsalz der Carbonsäure in DMF [Del Soldato, 2003] (s. Abb. 2.122).

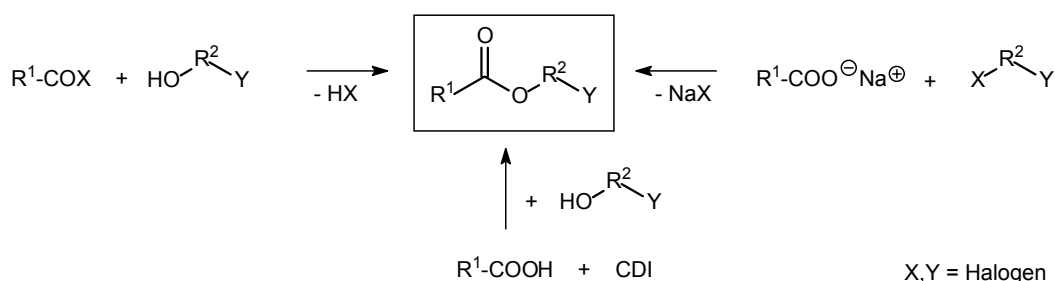


Abb. 2.122: Möglichkeiten der Darstellung der Bromverbindungen

Die im Rahmen dieser Arbeit dargestellten Ester aus den Bromanaloga von PEDiN bzw. PEMN und Flurbiprofen konnten über die Aktivierung der Carbonsäure mit CDI und Veresterung mit dem entsprechenden Alkohol erhalten werden (s. Abb. 122). Als Lösungsmittel wurde trockenes THF eingesetzt, welches, wie sich später herausstellte, im Vergleich zu Acetonitril zu geringeren Ausbeuten führte (s. Kap. 2.3.2).

Die Ester aus dem Bromanalogon von PEMN mit Flurbiprofen (**93**, **94**, **95**) können neben der Aktivierung mit CDI und anschließender Veresterung ebenfalls in einer Eintopfsynthese durch Umsetzung des Flurbiprofen-Säurechlorids (aus Flurbiprofen und Oxalylchlorid) mit 2-Brommethyl-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol in Toluol unter Zusatz von Pyridin als Base in ähnlichen Ausbeuten erhalten werden (s. Abb. 2.123).

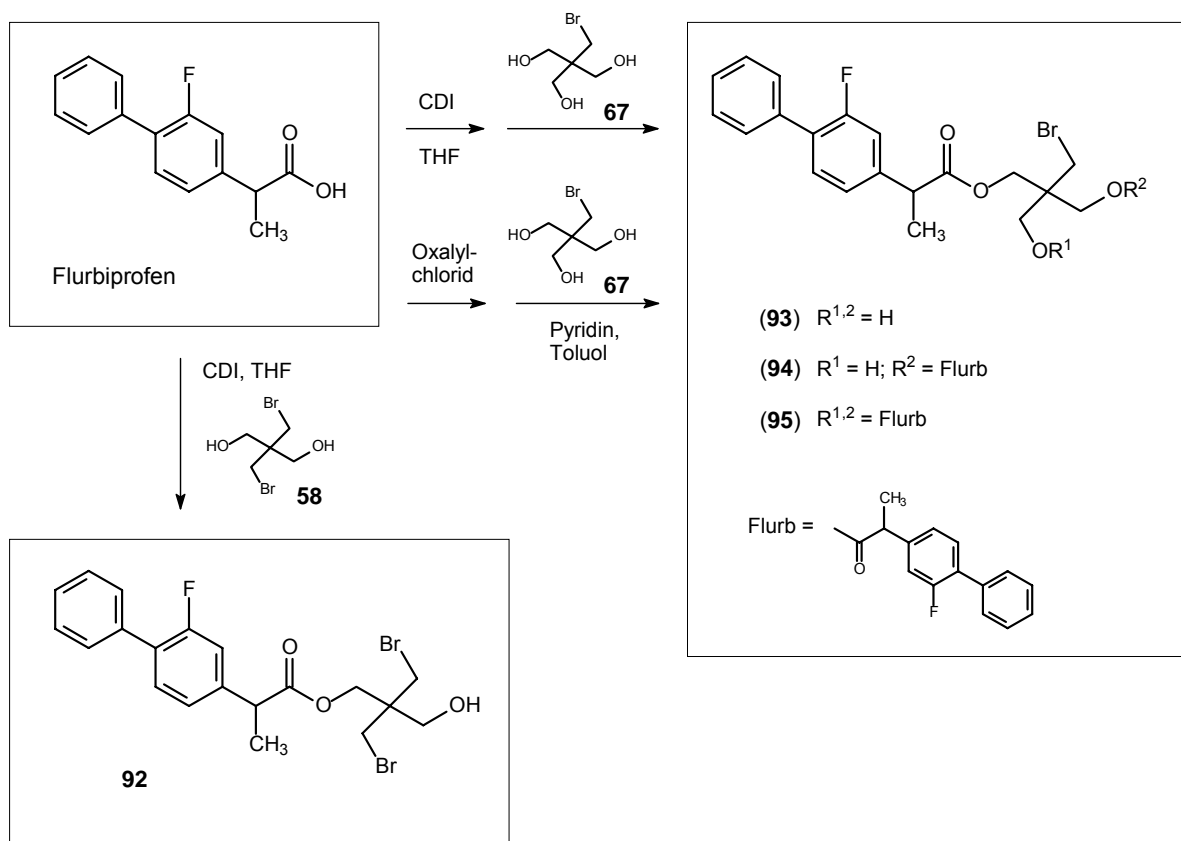


Abb. 2.123: Synthese der bromhaltigen Vorstufen der NSAID-Organonitrat-Hybridverbindungen

Auf beiden Synthesewegen entstanden sowohl der Monoester **93** als auch Di- (**94**) und Triester **95** in unterschiedlichen Verhältnissen, die sich säulenchromatographisch mit Hexan/Ethylacetat 2/1 gut voneinander trennen ließen. Lediglich die Isolierung von **93** bereitete aufgrund des niedrigen R_f -Wertes Probleme, da Diffusionseffekte wie Längsdiffusion und Mehrwegeeffekt auf der Säule verstärkt ins Gewicht fielen und durch Zonenverbreiterung und –überlappung die Ausbeute verminderten. Da alle drei

Verbindungen in einem einzigen Syntheseansatz dargestellt wurden, fielen die Ausbeuten der einzelnen Substanzen im Bezug auf die eingesetzte Menge Flurbiprofen naturgemäß gering aus.

Anhand der NMR-Spektren von **92** und **93** sollen beispielhaft die Verschiebungsmuster der Verbindungen zusammengefaßt werden. Der Bereich der aromatischen Protonen von **92** und **93** zeigt durch die Integration von 6 + 2 H in Verbindung mit den Integralen der Signale des Propandiols das Vorhandensein eines Monoesters an. In den Spektren des Di- und Triesters **94** und **95** verhalten sich die Integrationsverhältnisse entsprechend der Anzahl der Flurbiprofenester im Gesamtmolekül.

Im Spektrum von **92** sind das Quartett des Methinprotons bei 3,74 ppm sowie das Dublett der drei Methylprotonen bei 1,50 ppm zu erkennen. Die Zusammengehörigkeit der Signale wird durch die identische vicinale Kopplungskonstante von 7,1 Hz sowie durch die erwartete Multiplizität bestätigt.

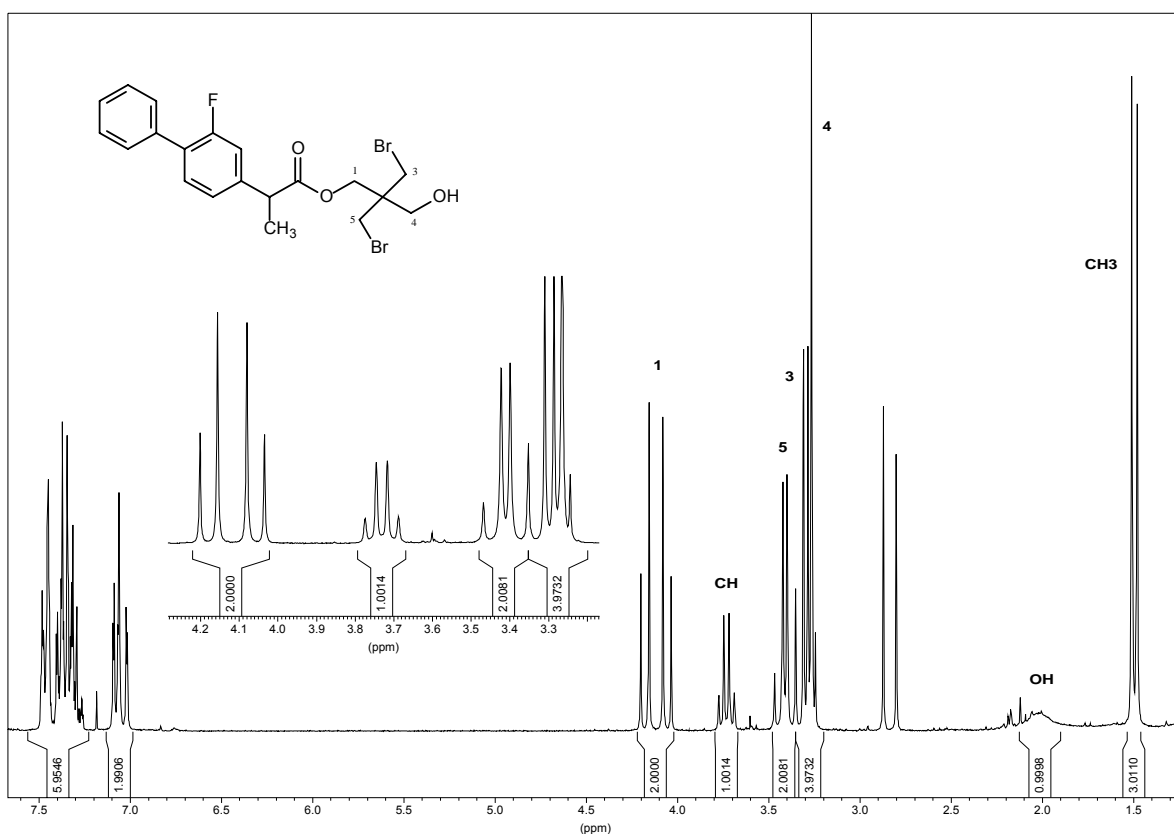


Abb. 2.124: ¹H-NMR von 3-Brom-2-(brommethyl)-2-(hydroxymethyl)propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (CDCl₃) (**92**)

Zusätzlich zu den Signalen des Flurbiprofens sind im ¹H-NMR der Verbindung **92** noch die drei Signale der Methylenprotonen zu finden. Das am weitesten im Tieffeld liegende Paar von Dubletts bei 4,06 bzw. 4,18 ppm resultiert aus der unterschiedlichen

Resonanzfrequenz der nicht mehr äquivalenten Methylenprotonen in der Nachbarschaft zur Estergruppierung, wobei die spezielle Aufspaltung der Signale jedes Protons in ein Dublett mit einer geminalen Kopplungskonstante von 11,3 Hz durch die Nähe des chiralen Kohlenstoffs der Methingruppe hervorgerufen wird. Diese Aufspaltung des Signals findet sich auch bei **93** wieder. Die einzelnen Protonen der Hydroxymethylen- bzw. Brommethylengruppen im Bereich von 3,24 - 3,47 ppm erscheinen ebenfalls als Dubletts bzw. Singulett. Ein verbreitertes Singulett bei 1,95 ppm mit der Integration von 1 H ist dem OH-Proton zuzuordnen.

Die Verbindung **93** ergibt ein ähnliches ^1H -NMR wie **92**, jedoch mit dem Unterschied, daß sich die Signale der Hydroxymethylenprotonen bei 3,47 – 3,59 ppm nicht mehr mit dem der Brommethylenprotonen überlagern, sondern getrennte Signale ergeben. Die nahezu zu einem Singulett zusammenfallenden Dubletts der beiden Brommethylenprotonen mit der Integration von insgesamt 2 H erscheinen dabei hochfeldverschoben bei 3,30 bzw. 3,35 ppm aufgrund des geringeren entschirmenden Effektes des benachbarten Bromsubstituenten im Vergleich zum Sauerstoff der Hydroxygruppe. Ein verbreitertes Signal bei 2,32 ppm mit der Integration von 2 H zeigt die OH-Protonen an.

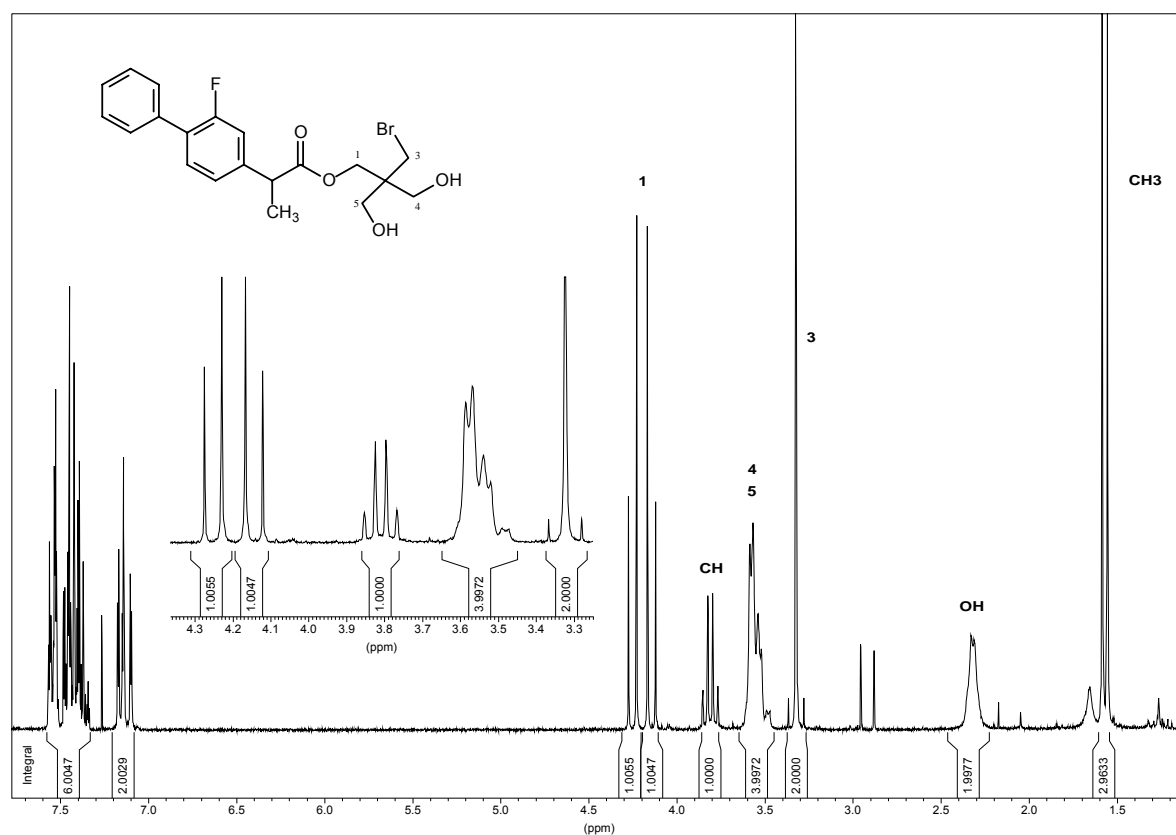


Abb. 2.125: ^1H -NMR von 3-Brom-2,2-bis(hydroxymethyl)propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (CDCl_3) (**93**)

In Abb. 2.126 sind die Aliphatenbereiche der Spektren des Mono- (**93**), Di- (**94**) und Triesters (**95**) mit 2-Brommethyl-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol (**67**) gegenübergestellt. Beim Triester ist deutlich das Fehlen eines Signals der Hydroxymethylen- sowie der Hydroxylgruppe zu erkennen. Die Signale bei 2,05 ppm sowie 4,13 ppm resultieren aus einem Restlösungsmittelgehalt an Ethylacetat.

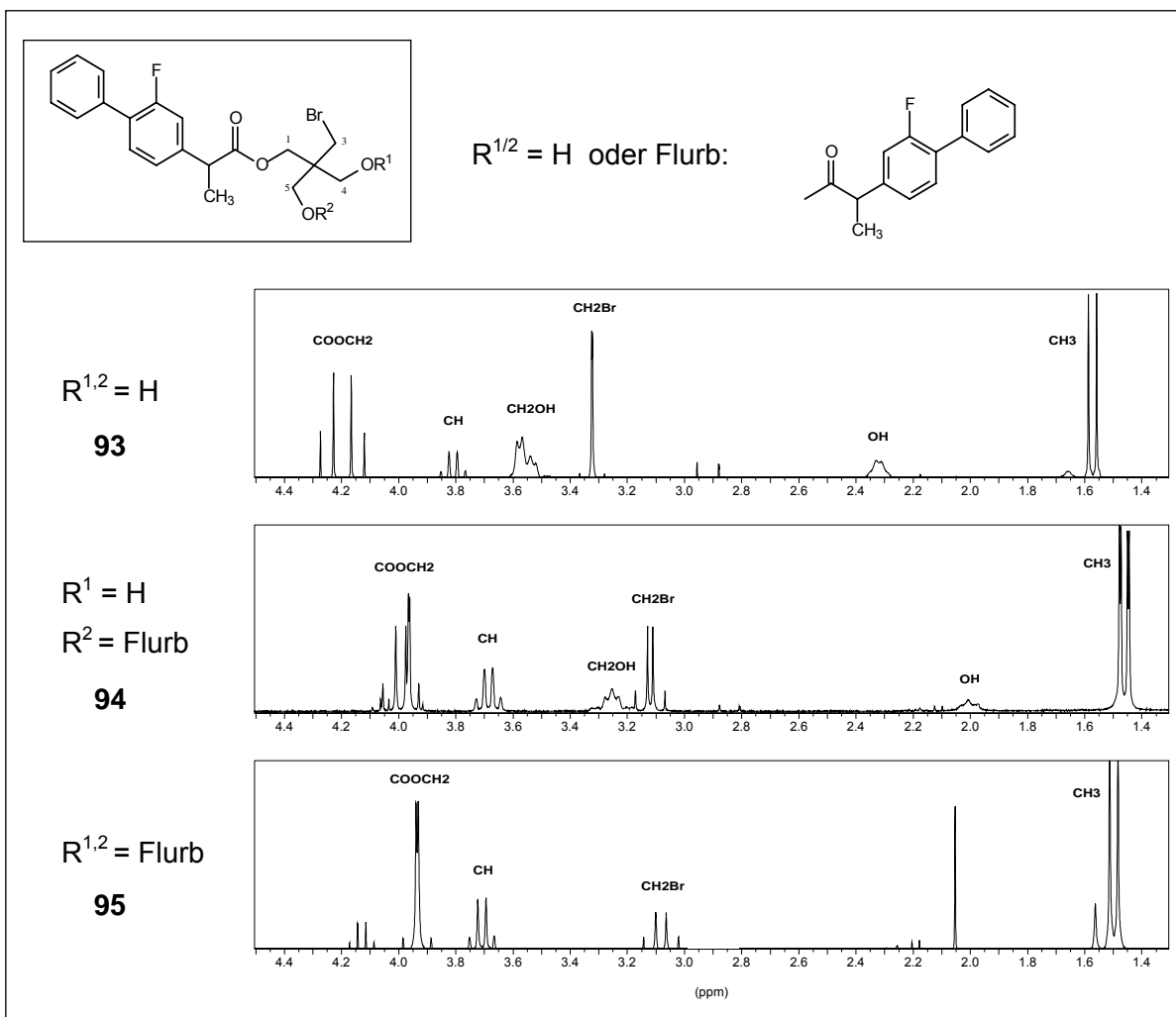


Abb. 2.126: Vergleich der Bereiche der aliphatischen Protonen in den ^1H -NMR-Spektren von **93**, **94** und **95**

2.3.1.2 Syntheseversuch zur Darstellung einer Flurbiprofen-PEDiN-Hybridverbindung (**16**)

In Anlehnung an die Synthese von 1,2-GDN (s. Kap. 2.2.6) sollten die erhaltenen Bromverbindungen mit Silbernitrat in Acetonitril in die entsprechenden Nitratverbindungen überführt werden (s. Abb. 2.127). Als Maß für die Umsatzgeschwindigkeit wurde die Menge an ausgefallenem AgBr gewertet, das während der gesamten Reaktionszeit in Abständen aus dem Reaktionsansatz entfernt wurde.

Als in einem ersten Syntheseversuch mit **92** zunächst nach vier Tagen bei RT und weiteren drei Tagen bei 50 und 85°C kein nennenswerter Stoffumsatz festgestellt werden konnte, wurden die Reaktionsbedingungen variiert, was ebenfalls keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte. Neben der Temperatur und Reaktionsdauer wurde das Lösungsmittel (THF, Acetonitril, Ether oder 1,2-Dimethoxyethan), die Menge an Lösungsmittel bzw. zugesetztem Silbernitrat verändert sowie Silbernitrat durch Quecksilbernitrat ersetzt. Ein Austausch des Lösungsmittels Acetonitril gegen THF, Ether oder 1,2-Dimethoxyethan führte innerhalb von 12 Tagen zu keinem ausreichenden Stoffumsatz. Bei erhöhter Temperatur von 70 - 80°C entstanden in allen Fällen viele Nebenprodukte, die eine säulenchromatographische Aufreinigung erschwerten, bei Raumtemperatur erfolgte dagegen keinerlei Umsetzung.

Schon Goldstein *et al.* [1966] berichteten, daß die Reaktion des Bromanalogons von PEDiN (**67**) mit Silbernitrat extrem langsam verläuft (90 Tage bei Raumtemperatur). Die sterische Hinderung durch den Flurbiprofenrest vermindert die Reaktionsgeschwindigkeit noch weiter.

Bei 30 - 40°C kam es ebenfalls zur Bildung von Nebenprodukten, allerdings in geringerem Maße als bei 70 - 80°C.

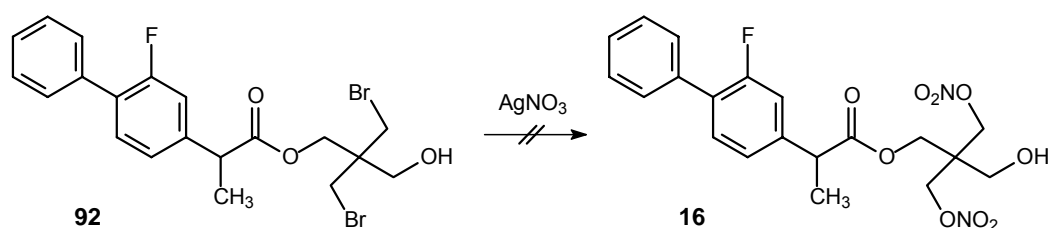


Abb. 2.127: Syntheseversuch von **16** aus **92** mit Silbernitrat

Eine chromatographische Abtrennung der Nitratverbindung von der Bromverbindung ist in der Literatur bisher nicht beschrieben und erscheint aufgrund des nahezu identischen chromatographischen Verhaltens der Moleküle nicht erfolgversprechend.

Die erhaltenen Ergebnisse legen nahe, zur Synthese der NSAID-Nitrat-Hybridsubstanzen einen anderen Darstellungsweg als über die Bromverbindung zu finden.

2.3.2 Synthese von Flurbiprofen-Organonitrat-Hybridsubstanzen unter Verwendung der aktiven Metaboliten des PETN

Aufgrund der geringen Umsatzgeschwindigkeiten bei der Synthese von **16** aus **92** mit Silbernitrat erschien die Darstellung der gewünschten NSAID-Nitrat-Hybridsubstanzen in Abb. 2.128 und 2.130 ausgehend von den PETN-Metaboliten erfolgversprechender.

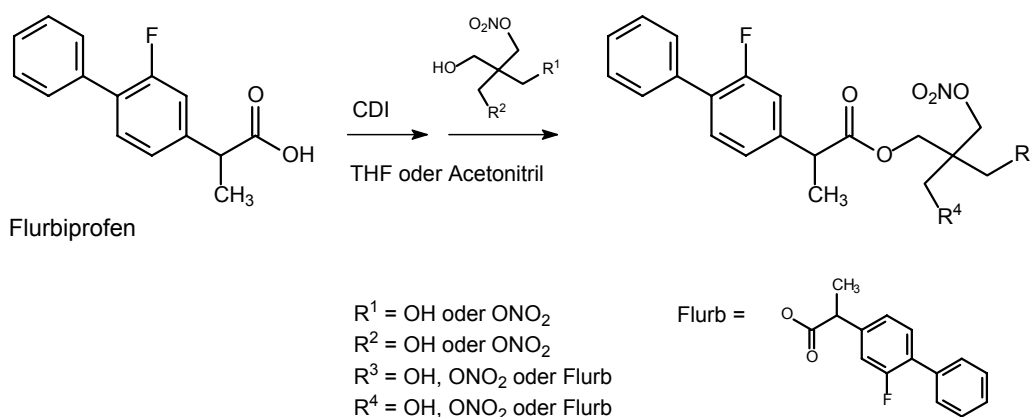


Abb. 2.128: Syntheschema für die Darstellung der Hybridverbindungen (s. auch Abb. 2.130)

Mit Pentaerythritol veresterte NSAIDs sind in der Literatur nicht beschrieben, hinreichend aber Ester aus Glycerol mit anderen nicht-steroidalen Antiphlogistika z.B. Naproxen. Beispielhaft sei hier die Arbeit von Zaffaroni [1972] erwähnt, der jeweils eine Synthese für Glycerol 1- und 2-[2-(6-methoxy-2-naphthyl)propionat] patentierte. Monoester aus Glycerol und Indometacin bzw. Acetylsalicylsäure konnten von Paris *et al.* [1979, 1980] z.B. durch Umsetzung von Isopropyliden- bzw. Benzylidenglycerol mit den jeweiligen Säurechloriden und anschließender Abspaltung der Schutzgruppen mit Triethylborat und Borsäure unter Erhitzen erhalten werden.

Ester aus Glycerol mit Flurbiprofen in unterschiedlichen Verhältnissen von 1:1 bis 1:3 sind in der Literatur ebenfalls in Patenten beschrieben, jedoch liegen hier keine genauen Synthesevorschriften vor – lediglich die Synthesewege sind erläutert. So stellten Svoboda *et al.* [1989 a,b, 1990] durch Veresterung von Glycerol mit 3 Molekülen des Säurechlorids **27** unter Zusatz von Triethylamin einen Triester des Flurbiprofen her. Dieselbe Arbeitsgruppe beschrieb auch den Monoester mit Glycerol. Eine andere Darstellungsweise für den Monoester schlugen Wechter *et al.* [2004] durch Umsetzung von Flurbiprofen mit Allylglycerol in Anwesenheit von polymergebundenem DCC und DMAP vor. Eine anschließende Abspaltung der Allylschutzgruppe mit verdünnter Essigsäure resultierte nach Aufreinigung ebenfalls im Monoglycerolester des Flurbiprofen.

Zwei Möglichkeiten zur Synthese des Diesters **97** stellen Ashton *et al.* [1995] heraus, indem sie einmal Dihydroxyaceton **85** mit dem Säurechlorid des Flurbiprofen (**27**) unter Zusatz von Pyridin acylierten und die erhaltene Verbindung **96** anschließend mit Natriumborhydrid in THF zum Alkohol **97** reduzierten. Andererseits beschrieben sie eine Synthese ausgehend von 1,3-Benzylidenglycerol (**101**), welches in mehreren Schritten durch Schützen der verbleibenden Hydroxylgruppe (**100**), saurer Hydrolyse des Acetals (**98**), Acylierung des erhaltenen Diols mit dem Säurechlorid des Flurbiprofen **27** (**99**) und anschließender Abspaltung der Benzylschutzgruppe mit 10% Palladium/Kohle in den Diester **97** überführt wurde.

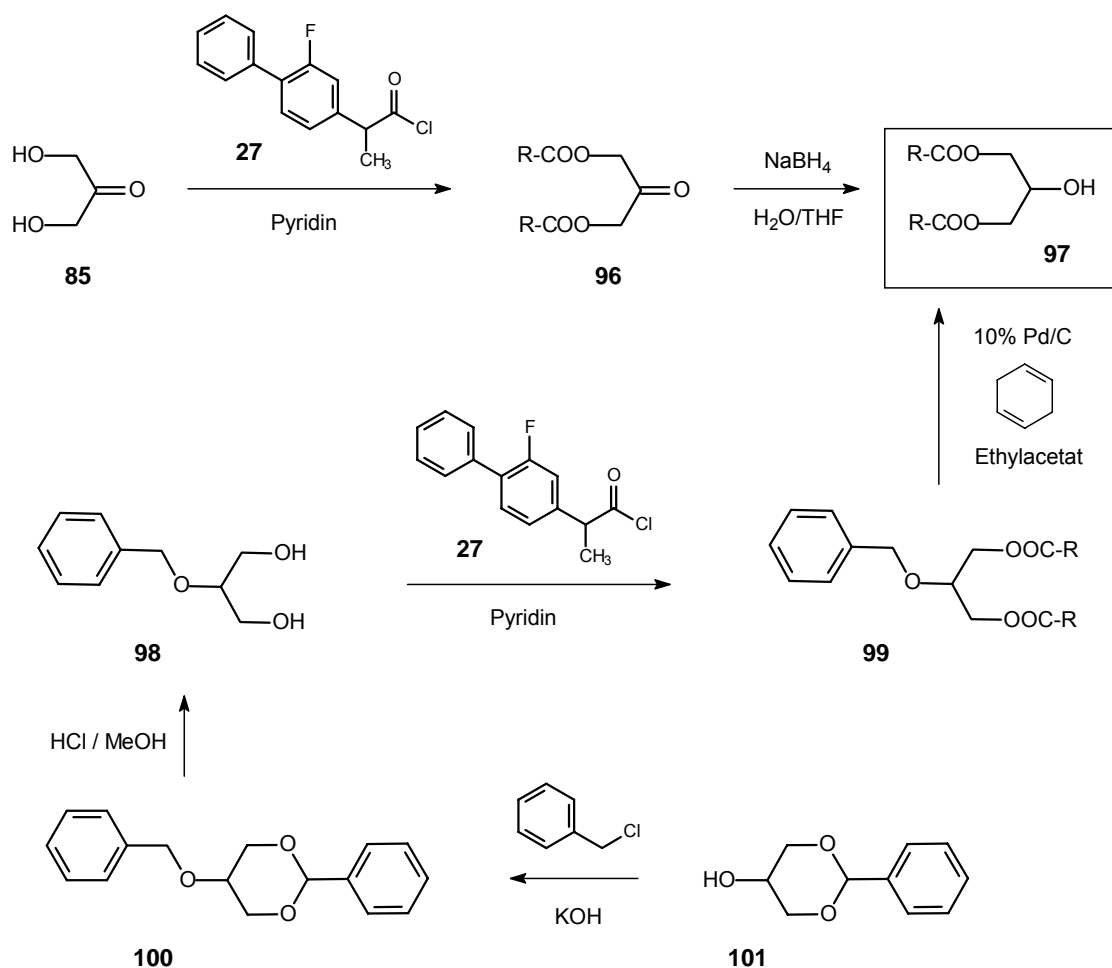


Abb. 2.129: Synthese des Diesters von Flurbiprofen nach Ashton *et al.* [1995]

Angaben über Nitrathybride aus NSAIDs mit PETN-Metaboliten finden sich in der Literatur nicht, jedoch sind einige Ester aus Glycerolnitraten mit NSAIDs bekannt.

Earl *et al.* [2004] koppelten z.B. 1,2-GDN mit Naproxen unter Zusatz von EDC und DMAP in 83%iger Ausbeute. Die Synthese desselben Produktes gelang ihnen auch auf einem anderen Weg ausgehend von ((4*S*)-2,2,4-trimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methan-1-ol und Naproxen. Als Nebenprodukt entstand dabei noch die 2-Hydroxy-3-Nitrooxypropylverbindung.

Ingram *et al.* [2001] synthetisierten zunächst einen Diester aus 2 Molekülen Ibuprofen und einem Molekül 3-Brom-1,2-propandiol und überführten diesen anschließend mit Silbernitrat in das entsprechende Mononitrat.

Durch Veresterung von PETriN (**6**), PEDiN (**7**) und PEMN (**8**), mit *S*- bzw., im Fall von **22**, *R*-Flurbiprofen konnten im Rahmen dieser Arbeit Flurbiprofen-Organonitrat-Hybridverbindungen in unterschiedlichen Verhältnissen dargestellt werden. Die synthetisierten Verbindungen sind mit ihren Synthesestrategien in Abb. 2.130 zusammengefaßt.

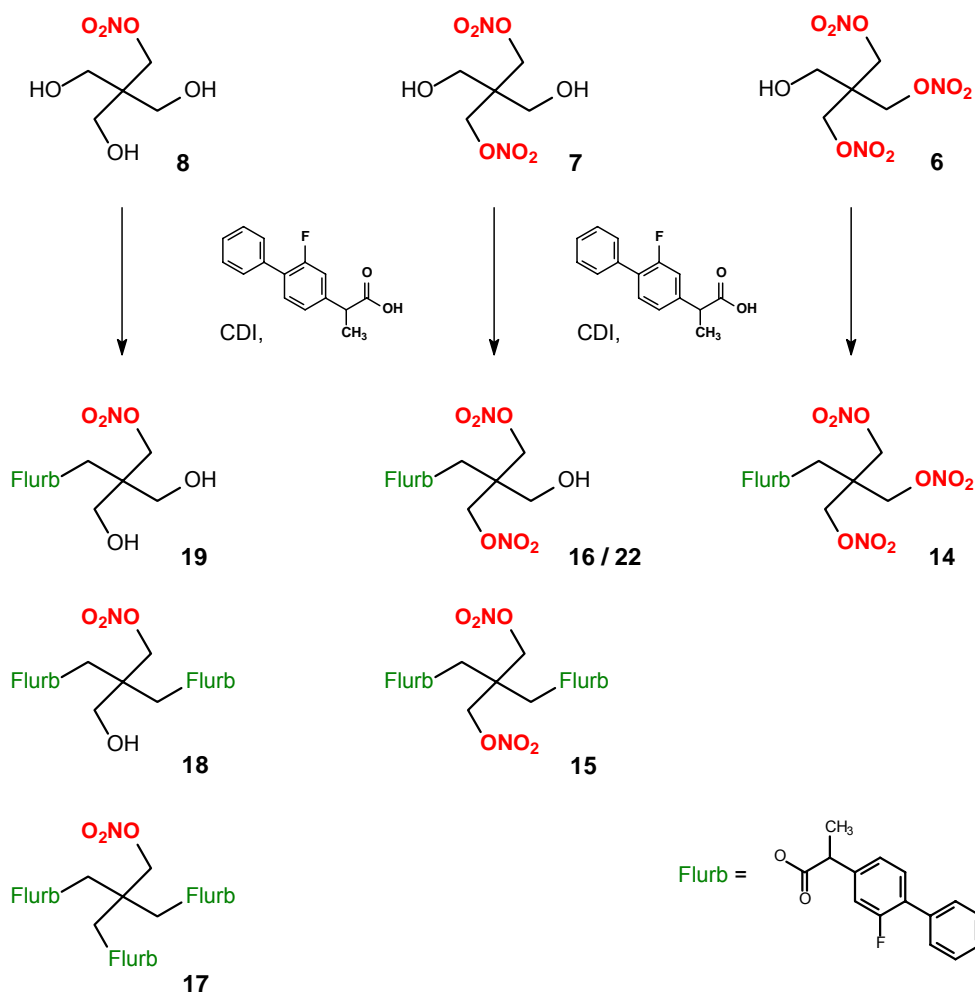


Abb. 2.130: Synthese der NSAID-Nitrat-Hybridsubstanzen aus Flurbiprofen und den Metaboliten des PETN; **22** wurde als einzige Verbindung mit *R*-Flurbiprofen, alle anderen mit *S*-Flurbiprofen, synthetisiert.

Carbonsäureester werden häufig durch Veresterung einer Carbonsäure mit einem Alkohol unter Verwendung katalytischer Mengen einer Mineralsäure wie Schwefelsäure, hergestellt. Aufgrund der Tatsache, daß zur Synthese der Substanzen mit freibleibender Hydroxylgruppe am PETN-Metaboliten kein Überschuß an Flurbiprofen eingesetzt werden konnte und ein Überschuß an PETN-Metaboliten nicht ökonomisch war, mußte eine Veresterung auf anderem Wege erreicht werden. Eine Entfernung des Reaktionswassers mit wasserentziehenden Reagenzien bzw. eine Aktivierung der Carbonsäure Flurbiprofen mit Aktivierungsreagenzien wie CDI, waren zwei Möglichkeiten, die in Betracht gezogen wurden.

Bei der Umsetzung einer Carbonsäure mit CDI entsteht zunächst ein Acylimidazol, welches in einem weiteren Reaktionsschritt mit dem Alkohol zum Ester reagiert. Als Nebenprodukt fällt neben Kohlendioxid nur Imidazol an, welches ohne Probleme bei der Extraktion entfernt werden kann (s. Abb. 2.131).

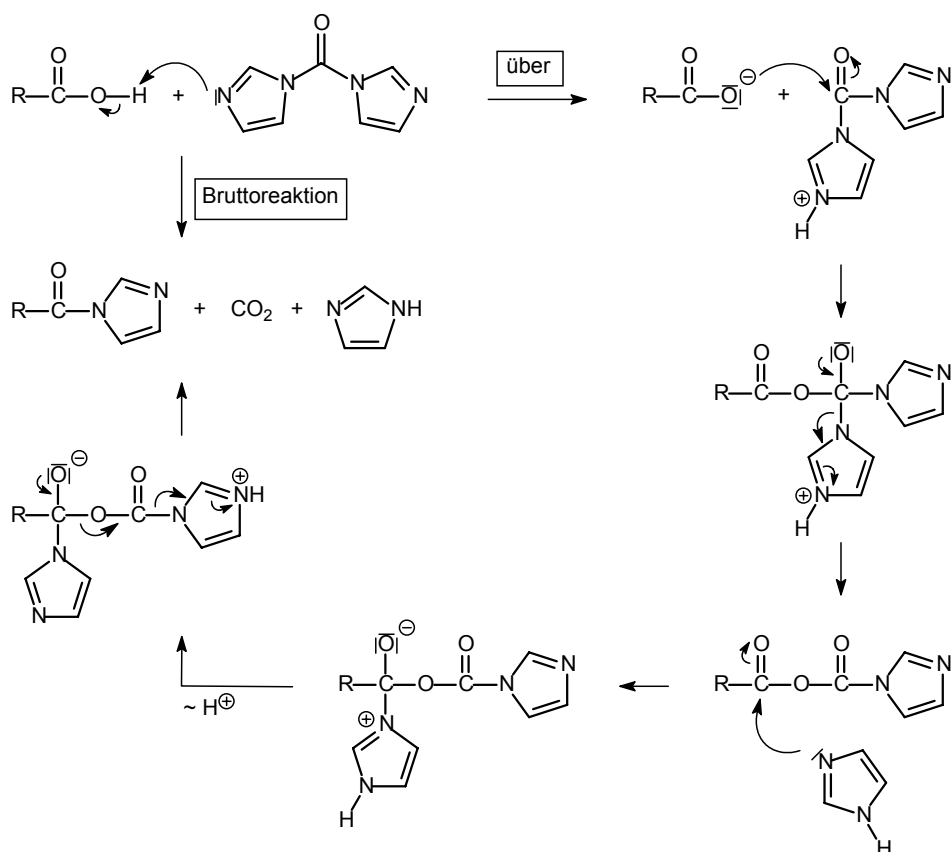


Abb. 2.131: Mechanismus der Aktivierung einer Carbonsäure mit CDI und anschließende Veresterung

Die Verwendung wasserfreier Lösungsmittel ist für einen erfolgreichen Reaktionsverlauf von essentieller Bedeutung, da sich CDI bei Kontakt mit Wasser sofort zersetzt. Um eine vollständige Aktivierung des eingesetzten Flurbiprofen sicherzustellen, wurde daher ein geringer Überschuß an CDI verwendet. Die Veresterung mit dem Alkohol (PETN-Metaboliten) erfolgte zur Vermeidung von Nebenreaktionen erst nach vollständiger Bildung des Acylimidazols nach etwa 1 - 1,5 Stunden, was sich in allen Fällen als erfolgreich erwies.

Im Verlaufe der Synthesen der entsprechenden Verbindungen wurde jedoch festgestellt, daß das normalerweise bei der Aktivierung mit CDI verwendete Lösungsmittel THF zu einer verringerten Ausbeute im Vergleich zu Acetonitril führte. Die zunächst in trockenem THF durchgeführte Synthese der Verbindung **16** ergab das Produkt nach säulenchromatographischer Aufreinigung nur in Ausbeuten von 21 %.

Aus diesem Grunde wurden analoge Syntheserversuche für **15** unternommen, die sich nur im verwendeten Lösungsmittel (THF bzw. Acetonitril) unterschieden. Nach Extraktion des eingedampften Rückstandes mit Ether und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung konnte bei dem Ansatz in THF eine Ausbeute von 46 %, beim Ansatz in Acetonitril dagegen 93 % erhalten werden.

Ein weiterer Beweis für den Lösungsmiteleinfluß findet sich in der Synthese der beiden Enantiomere **16** und **22**. Das R-Enantiomer **22** konnte analog dem S-Enantiomer **16** durch Veresterung von PEDiN und Flurbiprofen nach Aktivierung mit CDI dargestellt werden. Allerdings wurde hier Acetonitril anstelle von THF als Lösungsmittel verwendet. Wie schon bei der Synthese von **15** festgestellt werden konnte, erwies sich dieses Lösungsmittel als wesentlich günstiger für die Umsetzung, was auch anhand der höheren Ausbeute von 62 % für **22** im Vergleich zu 21 % bei **16** und der geringeren Reaktionsdauer von 20 Stunden gegenüber 14 Tagen deutlich wird.

Mit Ausnahme der Verbindung **16** wurden daher alle Synthesen in trockenem Acetonitril durchgeführt. Es wurde lediglich das eingesetzte molare Verhältnis Flurbiprofen : PETN-Metabolit variiert – je nachdem, ob ein Monoester, Diester oder Triester mit Flurbiprofen Ziel der Synthese war. Das jeweils im Unterschluß verwendete Edukt (Alkohol oder Carbonsäure) wurde über einen Tropftrichter langsam zugegeben. Im Falle von **15** gelang die Umsetzung durch Zutropfen einer Lösung von PEDiN in Acetonitril zur Lösung des bereits aktivierten Flurbiprofen (in Acetonitril). Auf diese Weise konnte bei den Synthesen eine möglichst hohe Ausbeute erreicht werden.

Die Aufreinigung der Substanzen erfolgte zunächst durch Extraktion des Verdampfungsrückstandes der Reaktionslösung mit Ethylacetat, Ether oder Dichlormethan. Durch Waschen der erhaltenen organischen Phase mit 10%iger Salzsäure konnte das bei der Aktivierung entstandene Imidazol, mit Natriumhydrogencarbonatlösung, das nicht umgesetzte Flurbiprofen in der wässrigen Phase abgetrennt werden. Lösungsmittelgemische für die anschließende säulenchromatographische Trennung fanden sich wie bei den jeweiligen Substanzen im Experimentellen Teil beschrieben, wobei in allen Fällen ein Gemisch von Ethylacetat/Hexan 60/40 die beste Auftrennung der Substanzen lieferte. Die Ausbeuten waren ausgezeichnet im Falle der vollständig veresterten Verbindungen **15** und **17** (93 bzw. 90 %), gut bei **22** (62 %), zufriedenstellend bei **18** und **16** (45 % bzw. 21 %) und schlecht bei **19** (4 %). Bei Letzterem ist die geringe Ausbeute durch Nebenreaktionen zu den zwei- und dreifach veresterten Verbindungen sowie durch eine langwierige säulenchromatographische Trennung zu erklären. Durch den kleinen R_F -Wert spielen Diffusionseffekte wie Längsdiffusion und Mehrwegeeffekt auf der Säule eine große Rolle, was die Substanzzone verbreitern und durch Zonenüberlappung die Ausbeute schmälern kann.

Die Identität der Verbindungen konnte in allen Fällen mittels NMR-Spektroskopie bestätigt werden. Beispielhaft seien hier die NMR-Spektren von **15** und **16** als Vertreter der PEDiN-Reihe sowie **14** aus PETriN und **19** aus PEMN erläutert und die der beiden Enantiomere **16** und **22** einander gegenübergestellt. Die Spektren ähneln sich stark in den Signalen der jeweils vorhandenen Gruppen. Leider sind alle synthetisierten Verbindungen Öle, so daß das zur säulenchromatographischen Aufreinigung verwendete Ethylacetat schlecht aus den Substanzen entfernt werden konnte und daher noch im NMR einiger Verbindungen wie **15** und **22** sichtbar war. Anhand der Höhe der Integrale der einzelnen Signale war es jedoch möglich, den überlagerten Signalen der Verbindungen entsprechende Protonenzahlen zuzuordnen.

Wie in Abb. 2.132 deutlich wird, sind die NMR-Spektren von Enantiomeren wie **16** und **22** in einem nicht chiralen Lösungsmittel wie DMSO exakt gleich. Eine Unterscheidung zwischen S- und R-Enantiomer ist daher nicht möglich. Die Diskussion des Spektrums von **22** besitzt somit auch für **16** Gültigkeit.

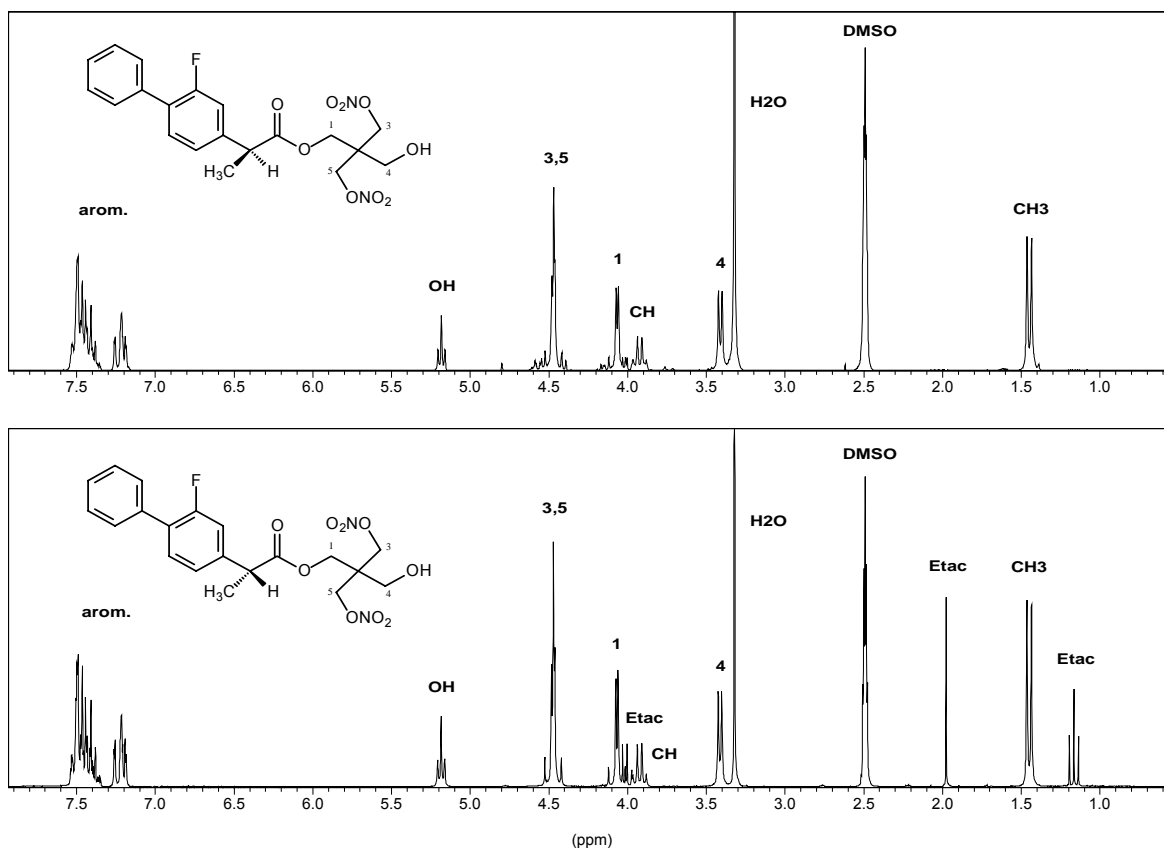


Abb. 2.132: ^1H -NMR-Spektren des (2S)- (**16**) und (2R)-Enantiomers (**22**) von 3-Hydroxy-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl 2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat ($[\text{D}_6]$ -DMSO)

Bei chiralen Molekülen beobachtet man häufig, daß geminale Methylenprotonen, auch wenn das Chiralitätszentrum nicht in unmittelbarer Nähe liegt, magnetisch nicht mehr äquivalent erscheinen. Sie werden als diastereotop bezeichnet, da der Austausch eines der beiden geminalen Wasserstoffatome gegen einen anderen Substituenten zum Entstehen eines weiteren Chiralitätszentrum und damit zu Diastereomeren führen würde. Solche Protonen treten bei unterschiedlichen Frequenzen in Resonanz und liefern somit Signale bei unterschiedlichen chemischen Verschiebungen. Im ^1H -NMR der Verbindung **22** (s. Abb. 2.133) wird dieser Effekt besonders bei der benachbart zur Estergruppierung liegenden Methylengruppe deutlich. Das eigentlich als Singulett erwartete Signal spaltet dabei zu zwei Dubletts bei 4,03 und 4,09 ppm auf. Beide Signale besitzen dieselbe geminale Kopplungskonstante von 11,5 Hz und zeigen einen deutlichen „Dacheffekt“, der darauf hinweist, daß die chemische Verschiebung des Kopplungspartners, also des anderen geminalen Protons, in unmittelbarer Nähe liegt. Durch die geringe Differenz der beiden σ -Werte kommt es zur Überlagerung beider Dubletts.

Das Tieffeldsignal bei 4,47 ppm stammt von den Nitrooxymethylenprotonen. Wie bereits bei PETriN (s. Kap. 2.2.3) beschrieben, ist die Tieffeldverschiebung im Vgl. zu den Hydroxymethylenprotonen eine Folge der Substitution durch die Nitratgruppe, welche

durch ihren elektronenziehenden Effekt eine Entschirmung der entsprechenden Methylengruppen bewirkt.

Das von den Methyleneinheiten der Hydroxymethylengruppe verursachte Signal erscheint dazu hochfeldverschoben bei 3,41 ppm als Dublett. Die Multiplizität ist infolge der Kopplung mit dem Proton der Hydroxylgruppe wie erwartet. Die Zusammengehörigkeit der Signale kann weiterhin durch die übereinstimmende vicinale Kopplungskonstante von 5,5 Hz bewiesen werden. Die Hydroxylgruppe wiederum bildet ein Triplet bei 5,18 ppm durch Kopplung mit den beiden Methyleneinheiten.

Alle vier Methylengruppen können als prochirale Gruppen verstanden werden, da bei Ersatz eines der Wasserstoffatome gegen einen anderen Substituenten ein neues Chiralitätszentrum neben dem Methinkohlenstoff des Flurbiprofenteils entsteht. Je nachdem, welcher Wasserstoff ersetzt wird, erhält man Diastereomere.

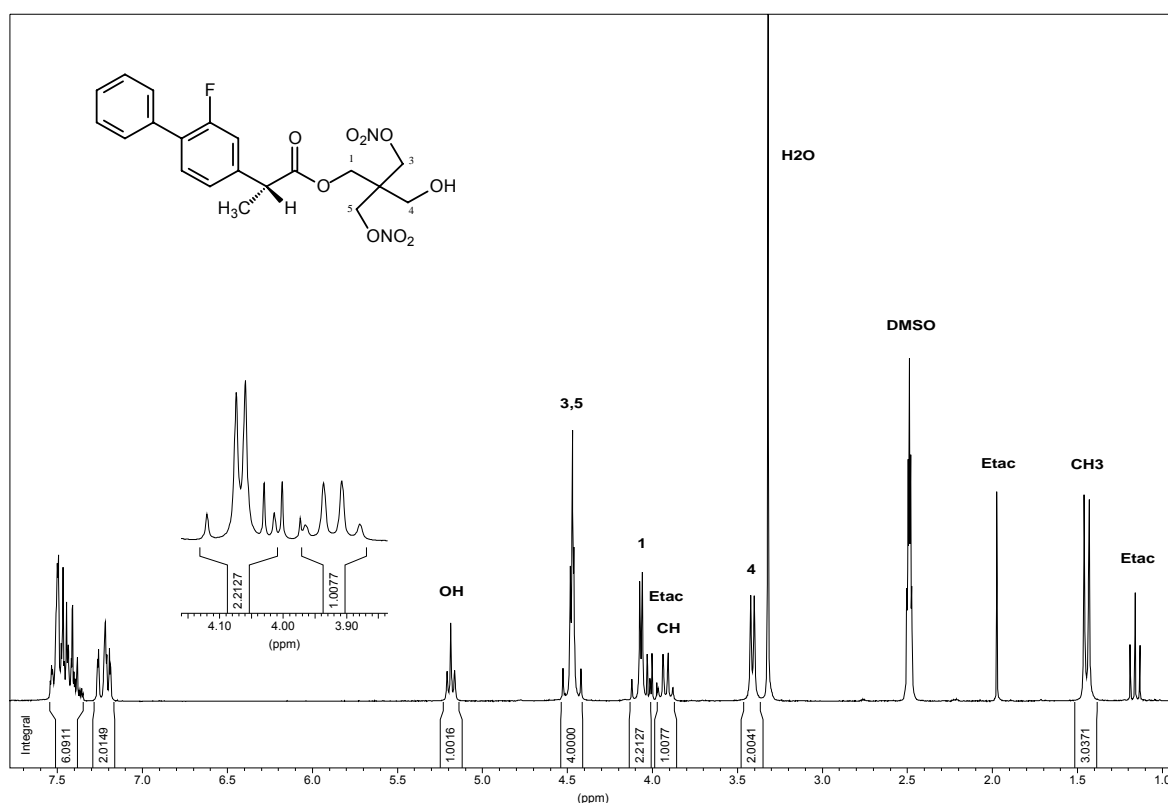


Abb. 2.133: ¹H-NMR-Spektrum von 3-Hydroxy-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl (2*R*)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat ([D₆]-DMSO) (**22**)

Die Signale der aromatischen Kohlenwasserstoffe von **22** erscheinen im ¹³C-NMR im Bereich von 115,36 - 161,31 ppm und entsprechen in ihren chemischen Verschiebungen denen des Flurbiprofen. Die Staffelung der chemischen Verschiebungen der Methylengruppen ist analog dem ¹H-NMR, d.h. am weitesten tieffeldverschoben finden sich die Signale der Nitrooxymethylenkohlenstoffe, am weitesten im hohen Feld kommt der Kohlenstoff der Hydroxymethylengruppe zur Resonanz. Die chemische Verschiebung

des benachbart zur Estergruppe liegenden Methylenkohlenstoffs erscheint dazwischen. Der quartäre Kohlenstoff des PEDiN-Teils zeigt ein Signal bei 43,38 ppm.

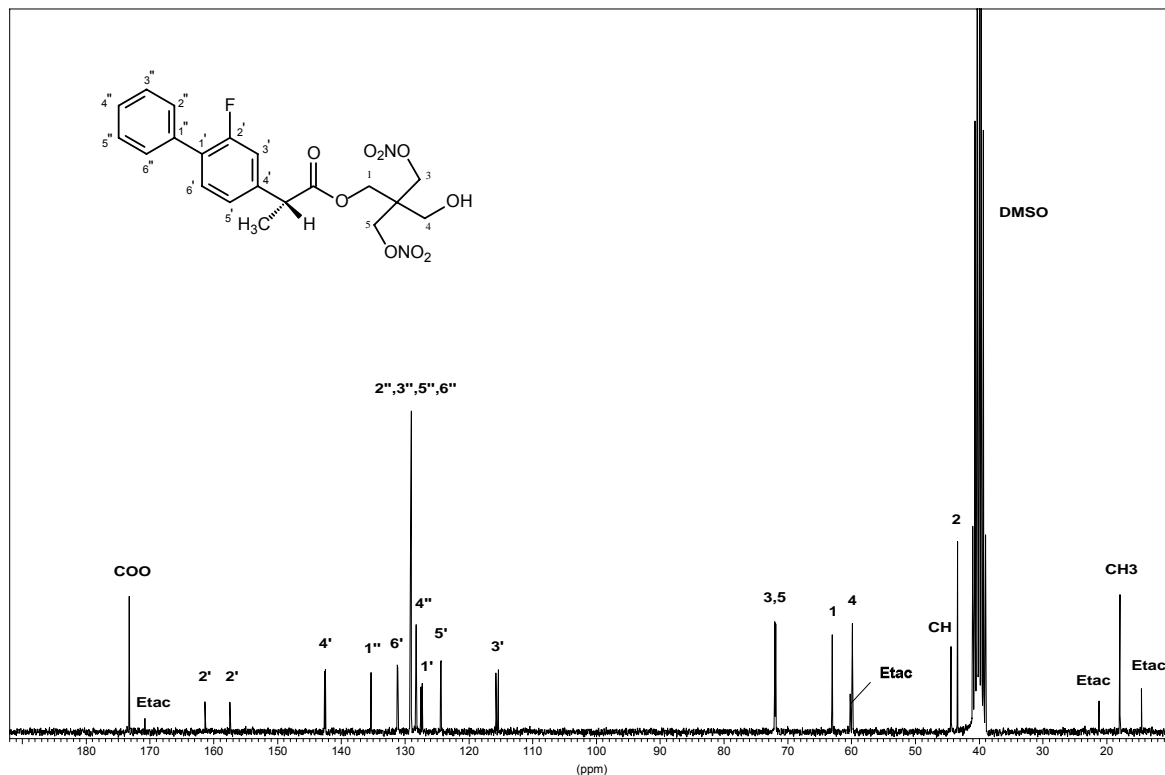


Abb. 2.134: ^{13}C -NMR-Spektrum von 3-Hydroxy-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl (2*R*)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$) (**22**)

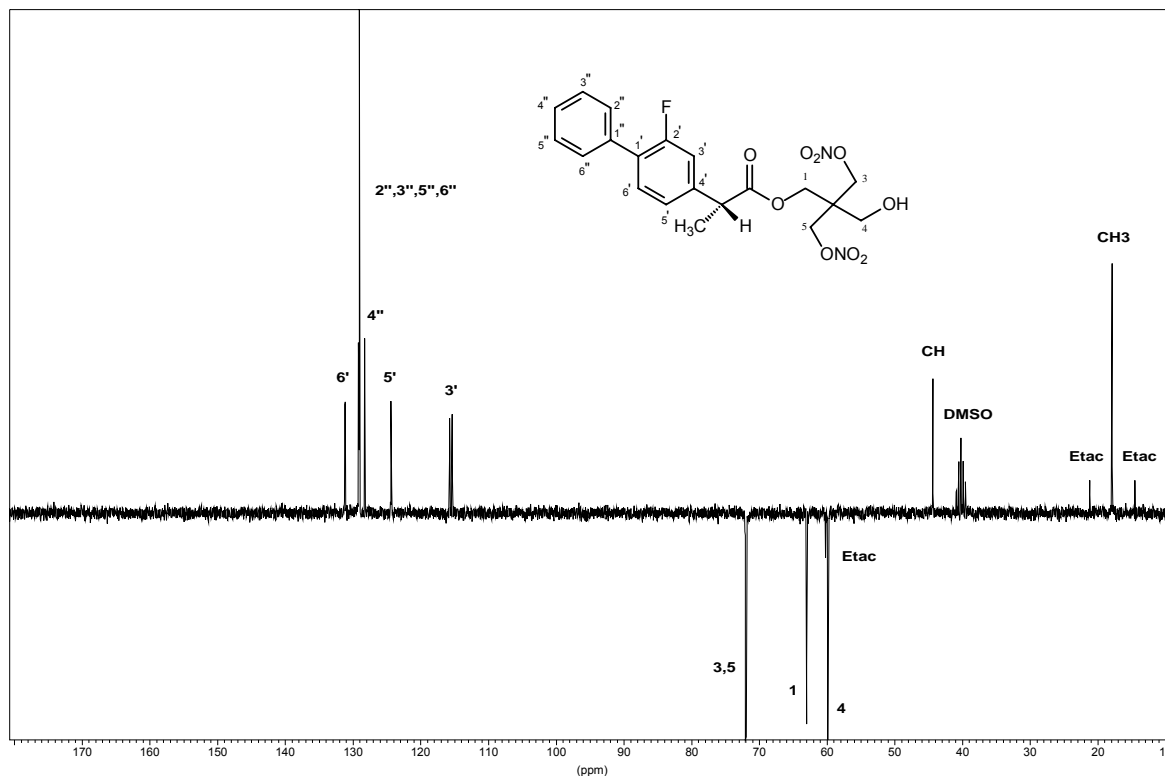


Abb. 2.135: DEPT-Spektrum von **22** ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$)

Die Identität der einzelnen Kohlenstoffatome des Moleküls konnte mit Hilfe eines DEPT-Spektrums (s. Abb. 2.135) bestätigt werden, da alle Signale quartärer Kohlenstoffatome nicht sichtbar sind und Methyl-/Methingruppen von Methylengruppen unterscheidbar werden.

Die Signale von Ethylacetat sind im ^1H -NMR bei 1,16 ppm (t), 1,97 ppm (s) und 4,02 ppm (q) und im ^{13}C -NMR bei 14,51 ppm, 21,18 ppm, 60,18 ppm und 170,76 ppm zu erkennen.

Die Signale der aromatischen Protonen der beiden Flurbiprofenmoleküle von **15** erscheinen jeweils überlagert von 7,15 - 7,51 ppm. Die Integration von 12 + 4 H beweist in Verbindung mit den Signalen der Nitrooxymethylengruppen eindeutig die Existenz eines Diesters. Alle vier Methylengruppen des Moleküls erscheinen als überlagerte Multipletts. Wie schon bei **22** (s.o.) beschrieben, liegt das Signal der Nitrooxymethylengruppen tieffeldverschoben bei 4,41 – 4,51 ppm.

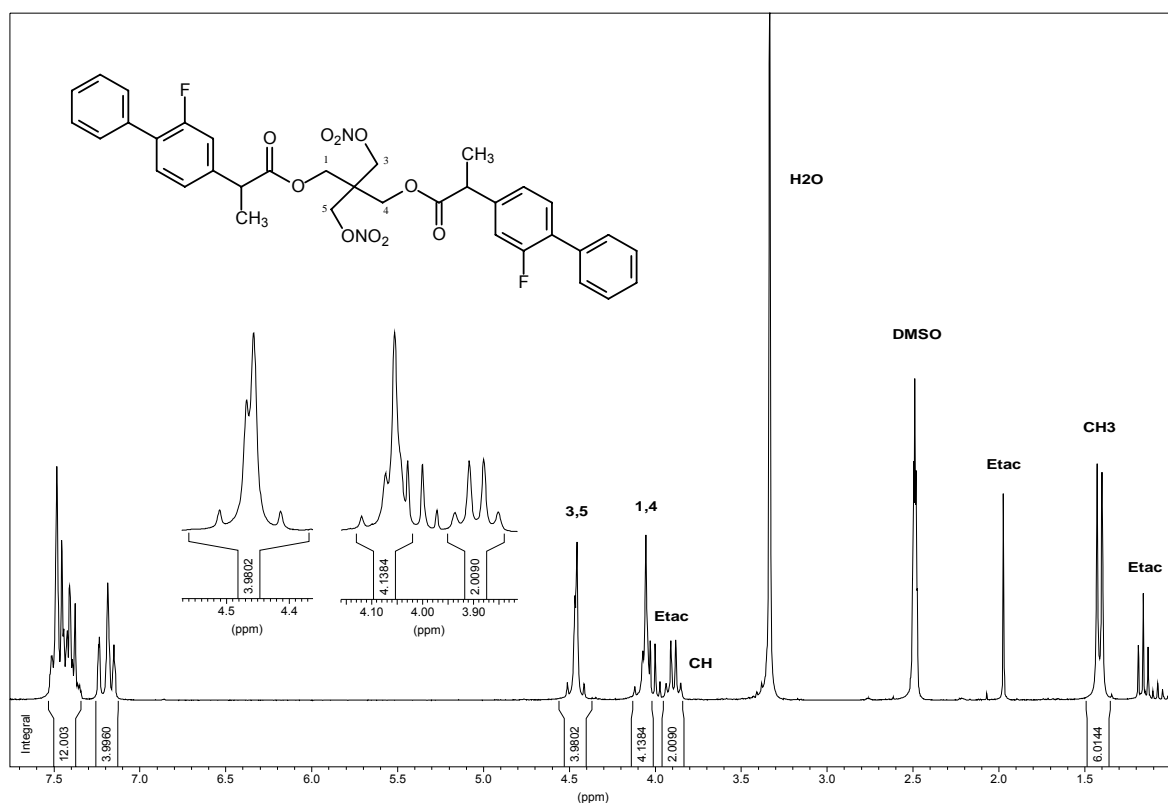


Abb. 2.136: ^1H -NMR-Spektrum von 3-Nitrooxy-2-(nitrooxy)methyl-2-[(2S)-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyloxy]methyl]propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat ($[\text{D}_6]$ -DMSO) (**15**)

Ein Vergleich der Spektren des Diesters **15** und des Monoesters **16** in Abb. 2.137 zeigt deutlich das Triplet des OH-Protons von **16** mit der Integration von 1 H sowie die Anwesenheit der dazu benachbart liegenden Methylengruppe bei 3,41 ppm mit der Integration von 2 H. Diese Signale fehlen bei **15** vollständig, dafür weist das Signal der zur

Estergruppe benachbart liegenden Methylengruppe bei 4,00 – 4,12 ppm die Integration 4 H auf anstatt 2 H wie bei **16**. Die Nitrooxymethylengruppen beider Verbindungen erscheinen mit der Integration 4 H bei etwa 4,41 – 4,51 ppm. Die weitere Veresterung hat auf die chemische Verschiebung der Signale dieser Protonen scheinbar nur einen minimalen Einfluß.

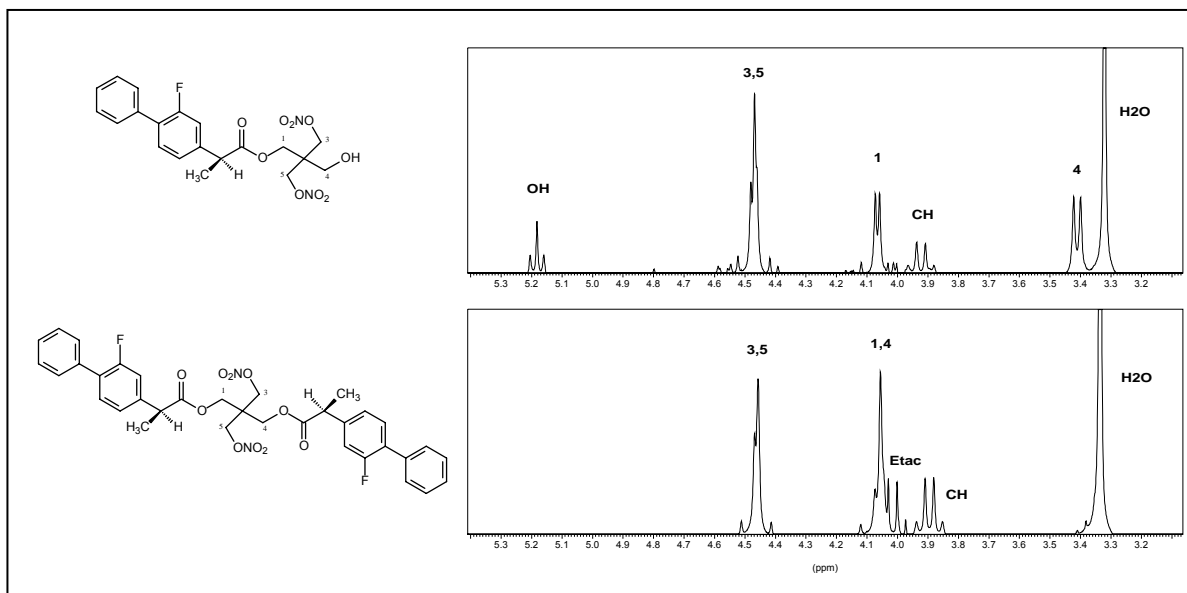


Abb. 2.137: Vergleich der Aliphatenbereiche der ^1H -NMR-Spektren des Monoesters **16** und Diesters **15**

Die ebenfalls chirale Verbindung **14** stellt einen Monoester aus Flurbiprofen und PETriN dar. Es ist daher zu erwarten, daß die 6 Protonen der Nitrooxymethylengruppen neben den 3 Protonen der Methylgruppe zu sehen sind, was durch das ^1H -NMR bestätigt wird. Die Methylgruppe erscheint durch Kopplung mit dem Methinproton bei 1,47 ppm als Dublett, das Methinproton wiederum erwartungsgemäß als Quartett bei 3,95 ppm. Die vicinalen Kopplungskonstanten stimmen bei beiden Signalen überein (7,2 Hz). Für die der Estergruppe benachbart liegende Methylengruppe sind die Signale der beiden Protonen aufgrund der Nähe des chiralen Methinkohlenstoffs nicht äquivalent und als Dubletts bei 4,16 ppm und 4,20 ppm mit einer geminalen Kopplungskonstante von $^2J = 11,7$ Hz zu erkennen. Die chemischen Verschiebungen sind so ähnlich, daß sich beide Dubletts fast zu einem Singulett überlagern. Die anderen 3 Methylengruppen erscheinen im Vergleich dazu bei 4,59 und 4,61 ppm erwartungsgemäß tieffeldverschoben aufgrund der entschirmenden Wirkung der Nitratgruppen. Die Integration von 6 H beweist das Vorliegen von 3 Nitrooxymethylengruppen. Wie schon bei der benachbart zur Estergruppe liegenden Methylengruppe erscheinen auch diese durch Überlagerung der Dubletts fast als Singulett. Vorhandene Hydroxymethylengruppen wie bei **16** würden etwa im Bereich

von 3,4 ppm benachbart zum Wassersignal erscheinen - durch das Fehlen eines entsprechenden Signals kann die Identität der Verbindung bestätigt werden.

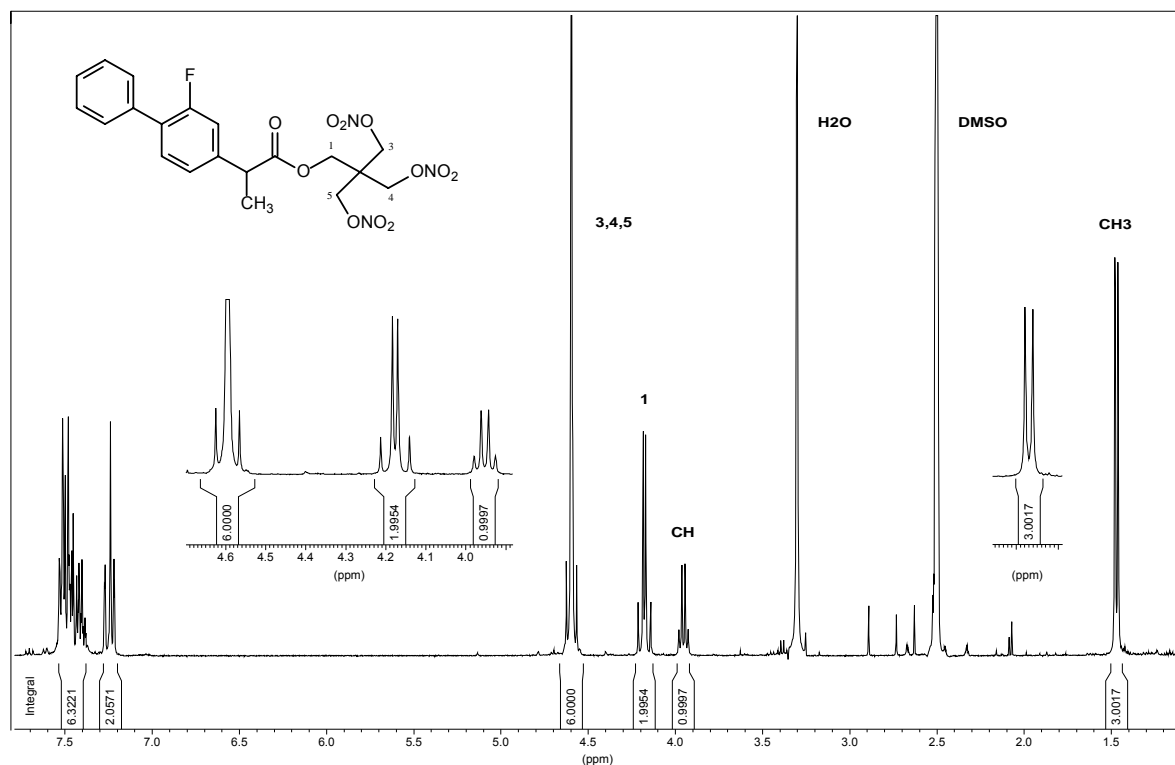


Abb. 2.138: ¹H-NMR von 3-Nitrooxy-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat ([D₆]-DMSO) (**14**)

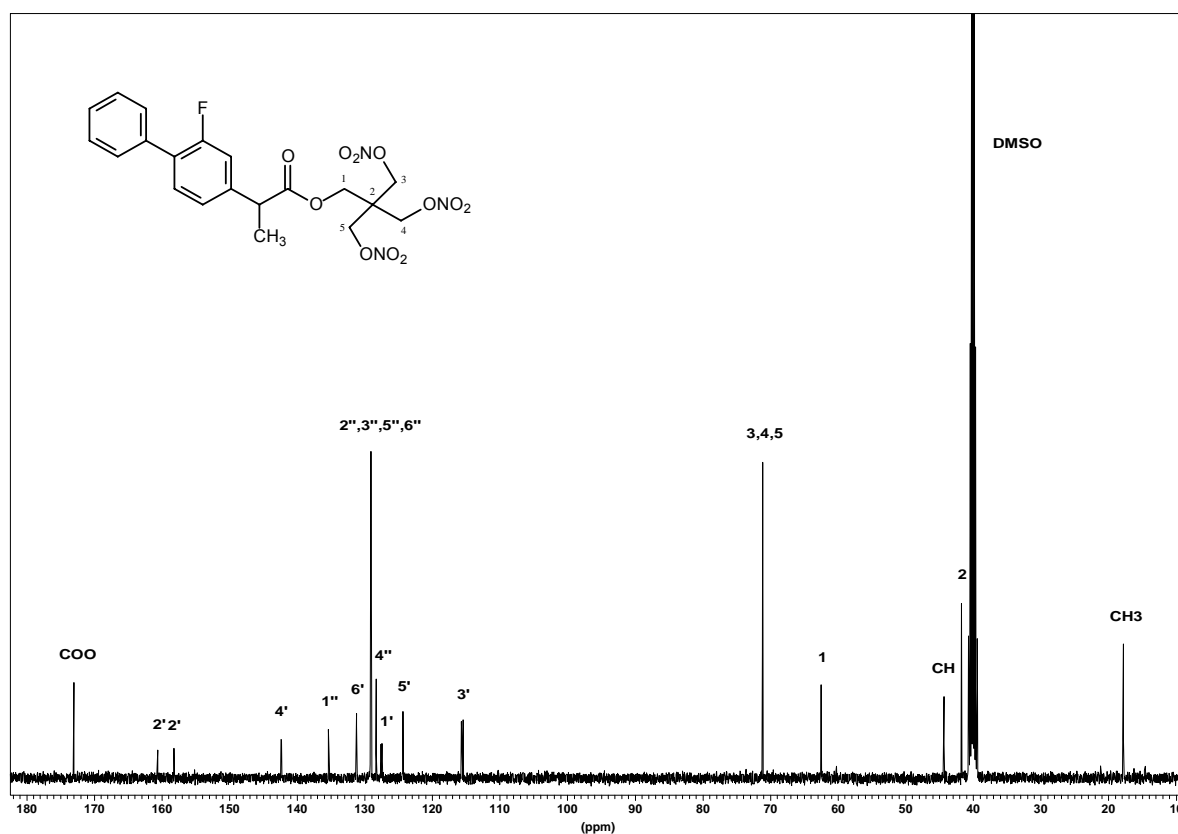


Abb. 2.139: ¹³C-NMR von (**14**) ([D₆]-DMSO)

Im Spektrum von **19** sind neben dem Acetonsignal (vom Spülen des Probenröhrchens) bei 2,04 ppm, dem Quartett der Methingruppe bei 3,78 ppm und dem Dublett der Methylgruppe des Flurbiprofen bei 1,56 ppm deutlich drei weitere Signale zu erkennen, welche den Methylengruppen des PEMN-Teils zugeordnet werden können. Das am weitesten tieffeldverschobene Singulett bei 4,41 ppm resultiert aus der Resonanz der Methylenprotonen in Nachbarschaft zur Nitratgruppe, welche einen entschirmenden Einfluß auf die in der Nähe liegenden Kerne ausübt. Infolge des geringeren –I-Effektes erscheinen die Dubletts der beiden Methylenprotonen neben der Estergruppierung dazu leicht hochfeldverschoben. Durch die Nähe des chiralen Zentrums sind beide Protonen nicht mehr äquivalent und geben Signale bei unterschiedlichen chemischen Verschiebungen (4,12 ppm bzw. 4,20 ppm). Das Multiplett der Hydroxymethylenprotonen liegt von den Signalen der Methylenprotonen am weitesten im Hochfeld im Bereich zwischen 3,99 und 4,10 ppm.

Die Integration der Signale der Methylenprotonen von insgesamt 8 H beweisen im Vergleich mit denen der aromatischen Protonen von 6 + 2 H eindeutig das Vorliegen eines Monoesters.

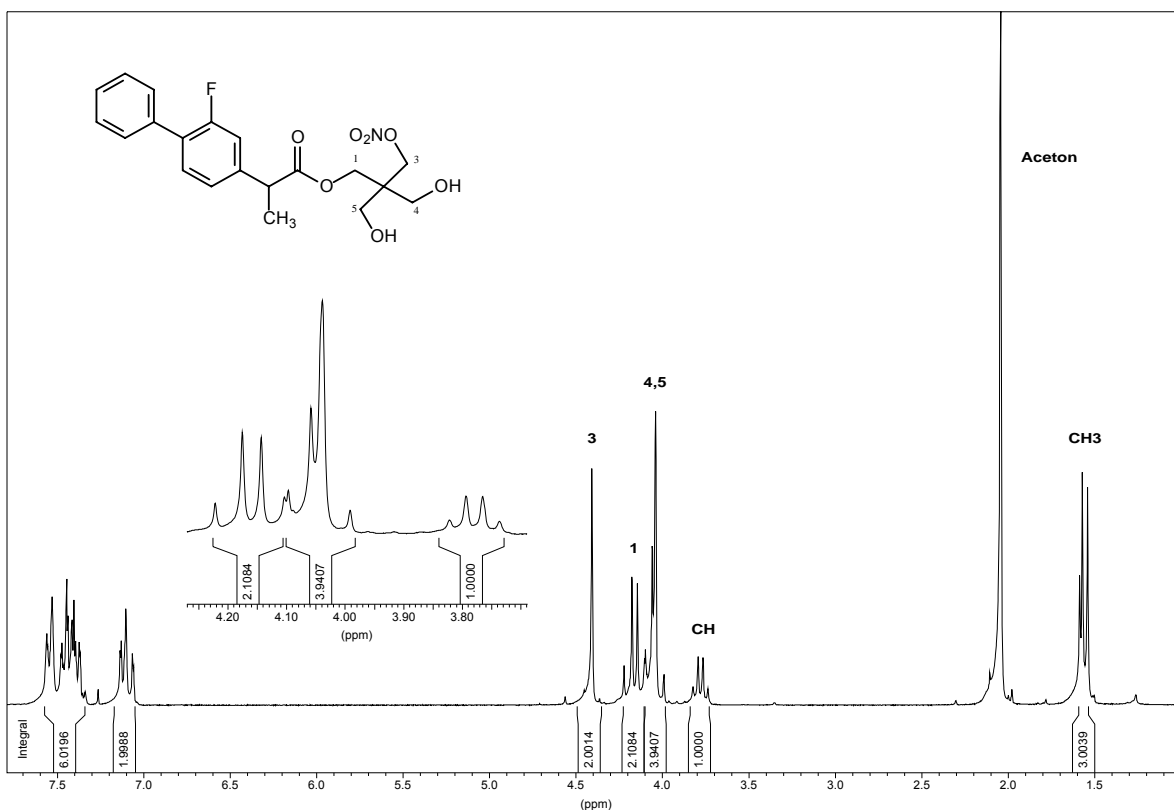


Abb. 2.140: ^1H -NMR von 3-Hydroxy-2-hydroxymethyl-2-[(nitrooxy)methyl]propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (**19**) (CDCl_3)

2.3.3 Synthese von Hybridsubstanzen aus Indometacin und PEDiN

Die Zielverbindungen wurden nach Aktivierung der Säuregruppe des Indometacin mit CDI durch Veresterung mit PEDiN (**7**) in THF hergestellt.

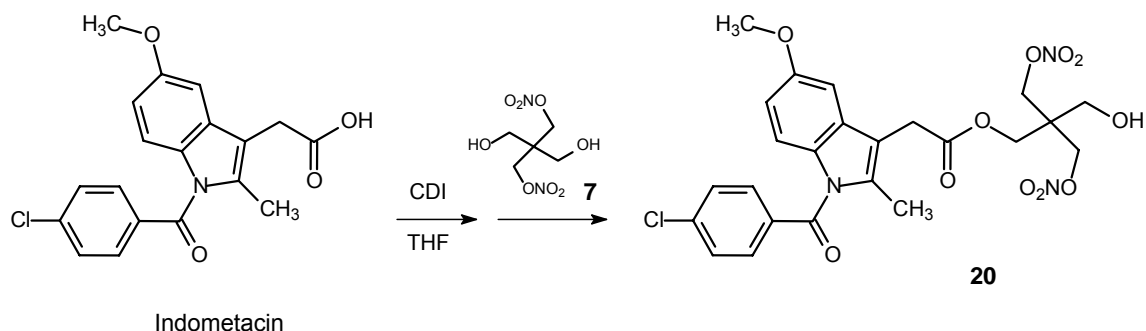


Abb. 2.141: Synthese von **20** durch Veresterung von Indometacin mit PEDiN

Anhand der dünnschichtchromatographischen Verlaufskontrolle konnte bei **20** eine größere Anzahl während der Synthese entstandener Nebenprodukte sowohl mit als auch ohne Nitratgruppen im Molekül bestimmt werden, wobei sich nur die nitrathaltigen Verbindungen mit Diphenylamin in konz. Schwefelsäure als Sprühreagenz anfärben ließen. Nach der problematischen Extraktion des Reaktionsgemisches mit Ether und der anschließenden aufwendigen säulenchromatographischen Aufreinigung des Rohproduktes konnte die Zielsubstanz daher nur in einer 17%igen Ausbeute erhalten werden. Eine Durchführung der Synthese in Acetonitril wie bei **15** (s. Kap. 2.3.2) hätte die Ausbeute unter Umständen steigern können.

Aufgrund des öligen Zustandes der Verbindung war wie bei den Flurbiprofenderivaten (s. Kap. 2.3.2) eine völlige Entfernung des SC-Fließmittelbestandteils Ethylacetat auch nach tagelangem Trocknen im Trockenrohr nicht erfolgt.

Im Vergleich mit dem ^1H -NMR-Spektrum von Indometacin sind die zusätzlichen Signale des PEDiN bei 3,42 ppm, 4,09 ppm, 4,48 ppm sowie 5,17 ppm deutlich zu erkennen (s. Abb. 2.142).

Im ^1H -NMR von **20** (s. Abb. 2.143) ist das Signal bei 3,42 ppm mit der Integration 2 H aufgrund der Kopplung zum OH-Proton zu einem Dublett aufgespalten und kann daher den Hydroxymethylenprotonen zugeordnet werden. Die vicinale Kopplungskonstante von 5,6 Hz stimmt mit der im Triplet des OH-Protons bei 5,17 ppm ermittelten Kopplungskonstanten überein und bestätigt damit die Zusammengehörigkeit der Signale.

Aufgrund der Kopplung des OH-Protons mit zwei äquivalenten Methylenprotonen ist die Multiplizität wie erwartet.

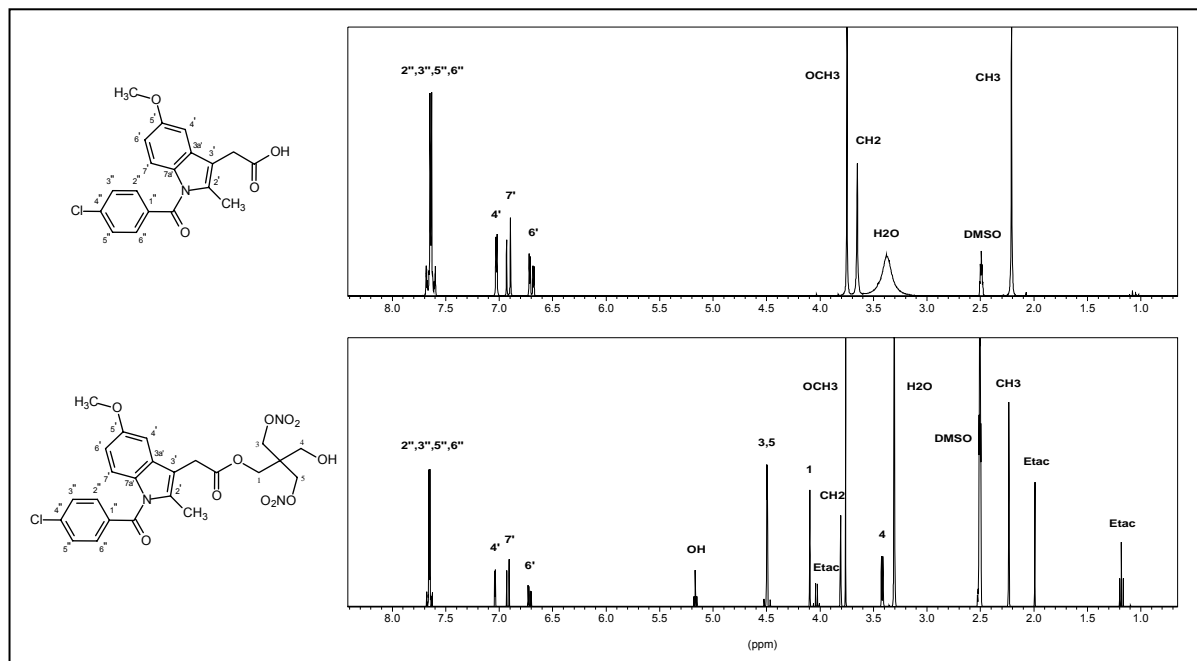


Abb. 2.142: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren von Indometacin und **20** ($[\text{D}_6]$ -DMSO)

Die benachbart zur Estergruppe befindlichen Methylenprotonen des PEDiN-Teils erscheinen infolge fehlender Kopplungspartner als Singulett bei 4,09 ppm. Dazu tieffeldverschoben, durch nahezu vollständige Überlagerung zweier Dubletts zum Pseudo-Singulett, sind die Signale der Nitrooxymethylenprotonen bei 4,48 und 4,51 ppm mit der Integration von insgesamt 4 H zu erkennen. Die Tieffeldverschiebung ist die Ursache des elektronenziehenden und damit entschirmenden Effektes der benachbarten Nitratgruppen (s. Kap. 2.2.3).

Die aromatischen Protonen 2'',3'',4'' und 5'' des Chlorbenzamids überlagern sich zu einem zentrierten Multiplett bei 7,63 – 7,68 ppm. Aufgrund der $-I$ -Effekte der Amidgruppe und des Chlorsubstituenten erscheinen sie von allen aromatischen Protonen am weitesten im Tieffeld.

Das Proton in Position 6' erscheint als Doppeldublett bei 6,70 – 6,73 ppm und koppelt mit einer vicinalen Kopplungskonstanten von 9,0 Hz mit dem benachbarten Proton 7', bei welchem dieselbe Kopplungskonstante im Signal ermittelt werden konnte. Durch Kopplung mit nur einem Proton erscheint Proton 7' als Dublett bei 6,92 ppm. Das Doppeldublett des Proton 6' zeigt allerdings noch eine kleine Kopplungskonstante von 2,4 Hz, welche auf eine Long-Range-Kopplung mit Proton 4' hindeutet, da das für 4' erwartete Singulett eine Feinaufspaltung der Linien in einer Größenordnung von ebenfalls

2,4 Hz zeigt. Es ergibt daher ein Dublett bei 7,05 ppm. Der Bereich der aromatischen Protonen stimmt mit dem Verschiebungsmuster des Indometacins überein.

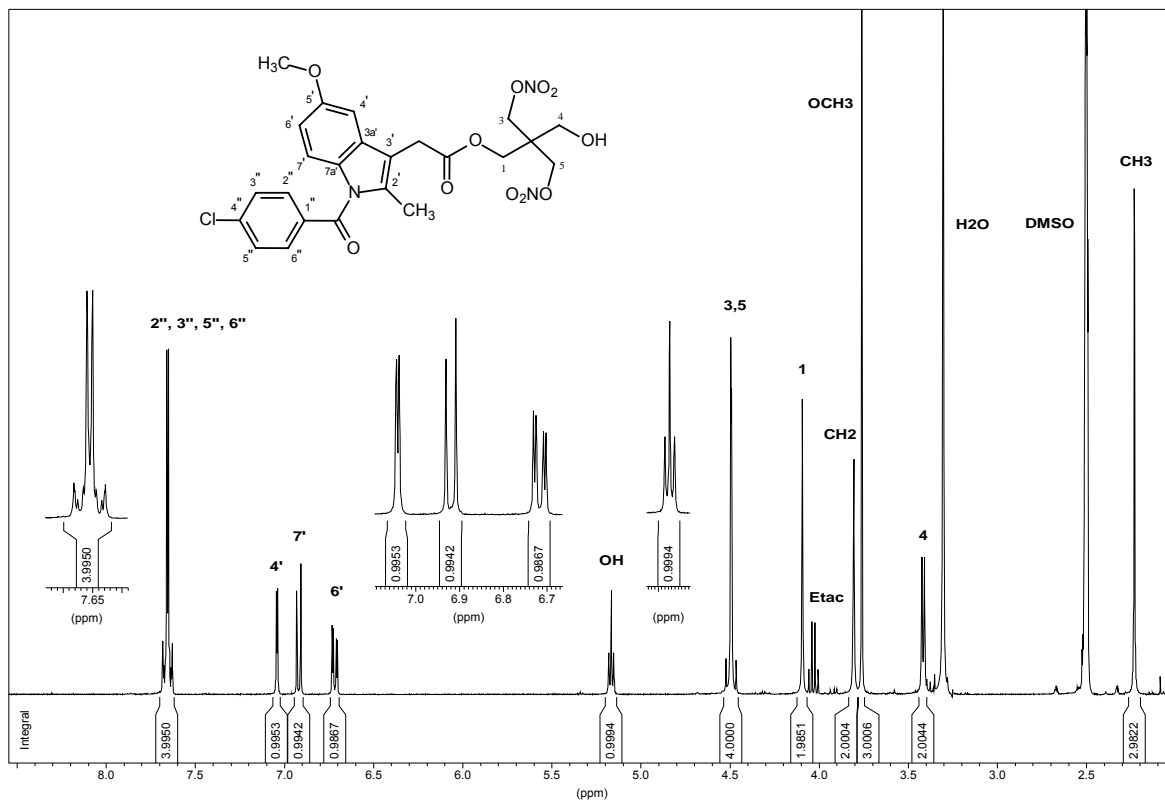


Abb. 2.143: ^1H -NMR von 3-Hydroxy-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl [1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl]acetat ($[\text{D}_6]$ -DMSO) (**20**)

Durch die Veresterung nimmt die Abschirmung des Carboxylkohlenstoffs zu und das Signal erscheint im ^{13}C -NMR geringfügig hochfeldverschoben bei 170,04 ppm im Vergleich zu Indometacin (172,01 ppm). Alle anderen Kohlenstoffatome des Indometacinteils von **20** werden durch die erfolgte Veresterung in ihren chemischen Verschiebungen nicht beeinflusst und erscheinen bei ähnlichen σ -Werten im ^{13}C -NMR. Die Zuordnung konnte anhand eines DEPT-Spektrums bestätigt werden, in dem CH- bzw. CH_3 -Gruppen von Methylenkohlenstoffatomen unterscheidbar und quartäre Kohlenstoffatome nicht sichtbar sind (s. Abb. 2.145).

Zusätzlich zu den Signalen des Indometacins erscheinen die Signale der Kohlenstoffatome des PEDiN-Teils im Spektrum bei 42,90 ppm, 59,27 ppm, 62,28 ppm und 71,43 ppm. Wie bereits beschrieben, treten auch die benachbart zu den Nitratgruppen befindlichen Kohlenstoffatome aufgrund des starken $-I$ -Effektes und der damit einhergehenden Verringerung der Elektronendichte bei tieferem Feld in Resonanz, was sich größeren σ -Werten im Vergleich zu den anderen Methylenkohlenstoffatomen äußert. Der quartäre Kohlenstoff des PEDiN konnte aufgrund des DEPT-Spektrums eindeutig dem Signal bei 42,90 ppm zugeordnet werden.

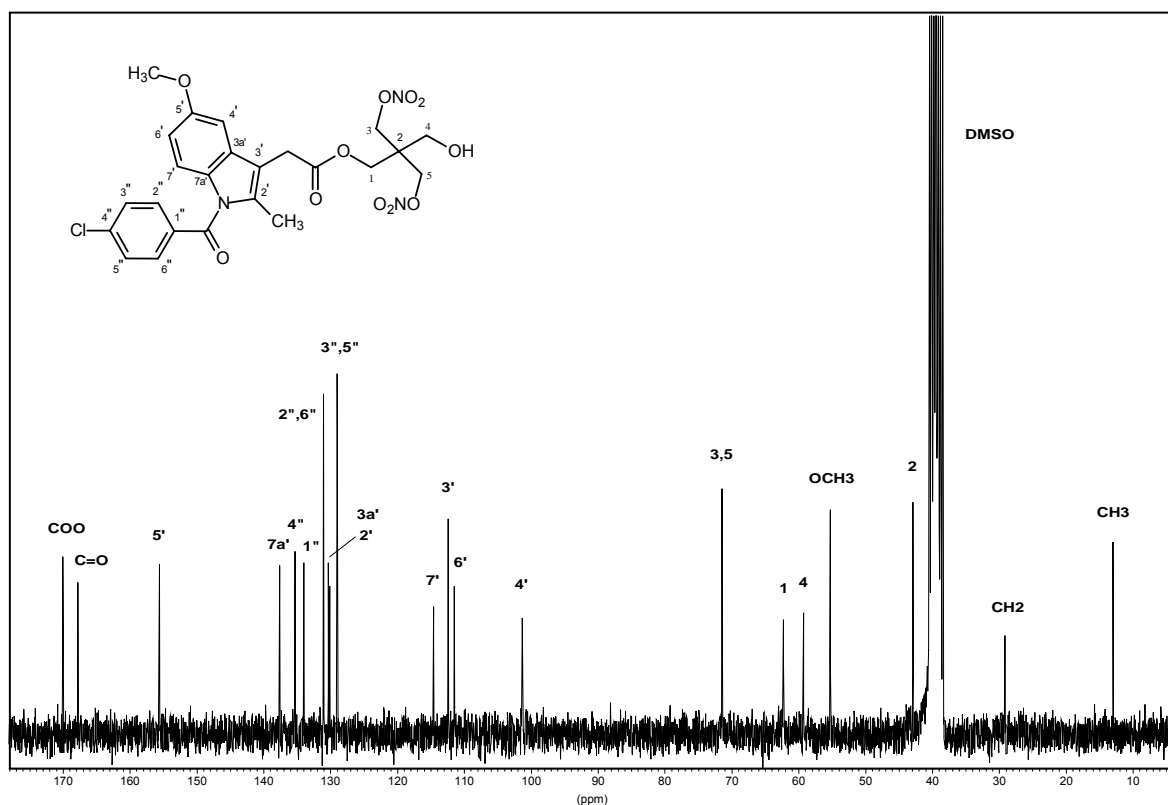


Abb. 2.144: ^{13}C -NMR von 3-Hydroxy-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl [1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl]acetat ($[\text{D}_6]$ -DMSO) (**20**)

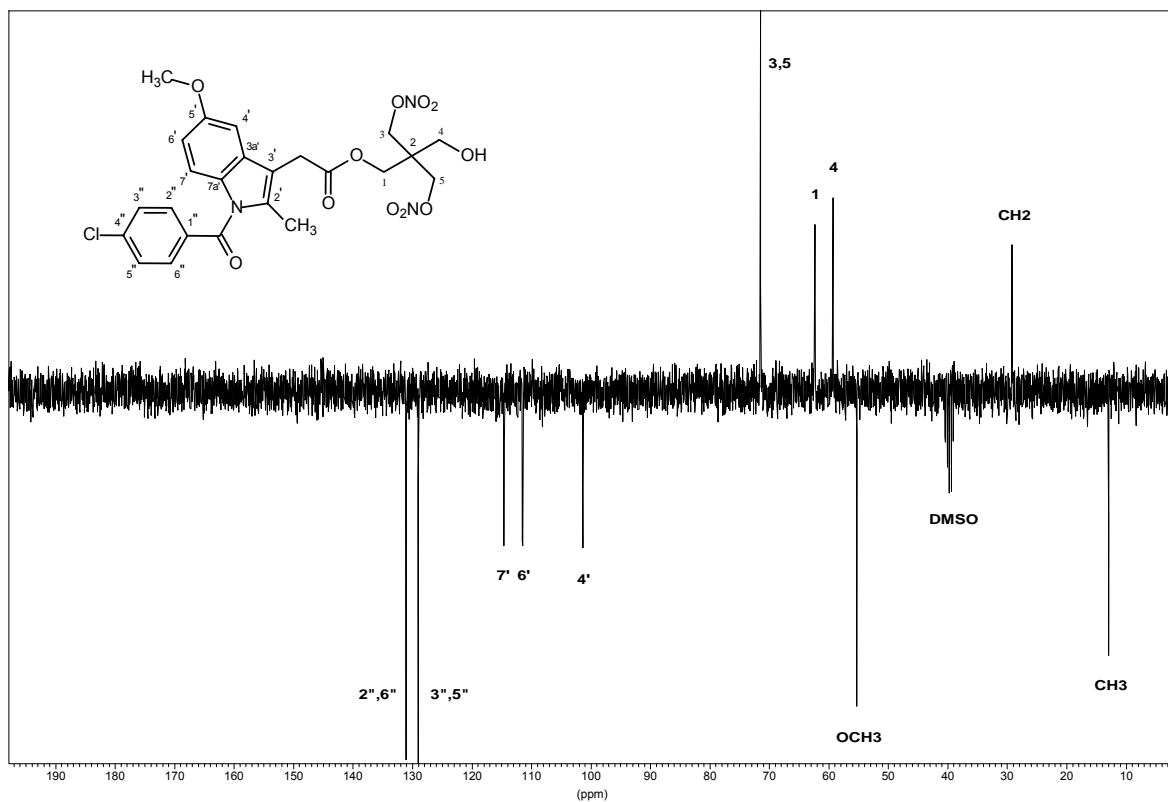


Abb. 2.145: DEPT-Spektrum von 3-Hydroxy-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl [1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl]acetat ($[\text{D}_6]$ -DMSO) (**20**)

Der Diester **21** wurde auf demselben Weg wie **20** mit gering veränderten Reaktionsbedingungen dargestellt. So wurde Indometacin im Überschuß eingesetzt und PEDiN zur Lösung des CDI-aktivierten NSAIDs hinzuge tropft um einen möglichst großen Stoffumsatz zu erzielen. Wie bereits beim Monoester beschrieben, verringerte sich allerdings auch hier die Ausbeute durch entstandene Nebenprodukte und eine säulenchromatographische Ausreinigung, so daß **21** nur in einer Ausbeute von 41 % erhalten werden konnte.

Das ^1H -NMR von **21** entspricht im Wesentlichen dem des Monoesters **20**, deutlich ist jedoch in Abb. 2.147 das Fehlen eines Dubletts der Hydroxymethylenprotonen bei 3,42 ppm sowie des Triplets des OH-Protons bei 5,17 ppm zu erkennen, was zusammen mit der Integration von jeweils 4 H für die beiden verschiedenen Methylengruppen des PEDiN-Teils die Identität eines Diesters bestätigt. Dies wird auch durch ein angefertigtes ^{13}C -NMR abgesichert, da das Signal des Hydroxymethylenkohlenstoffs von **20** bei 59,27 ppm nicht gefunden wurde.

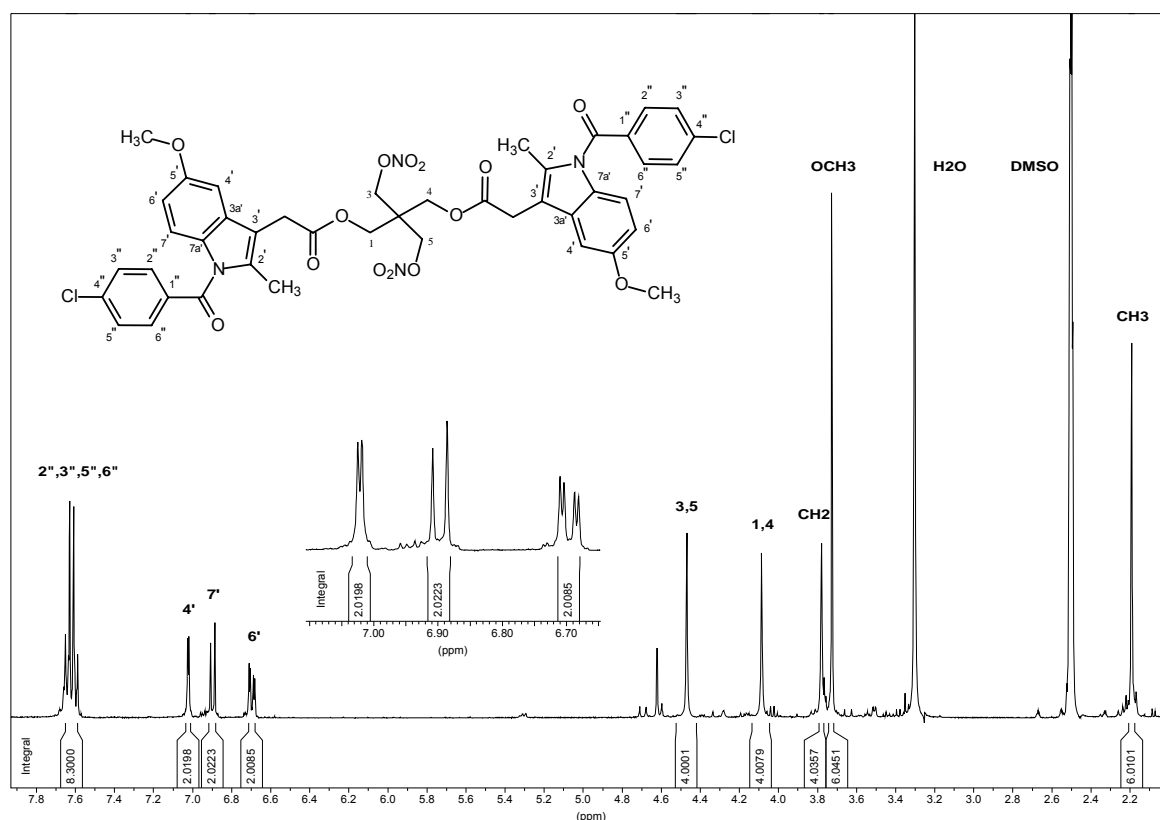


Abb. 2.146: ^1H -NMR von Strukturformel von 2-[1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl]acetoxymethyl-3-nitrooxy-2-[(nitrooxy)methyl]propyl [1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl]acetat ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$) (**21**)

2.3.4 Darstellung weiterer NSAID-Organonitrat-Hybridsubstanzen

2.3.4.1 Synthese von 2-(Nitrooxy)ethyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (110)

Aliphatische Nitrooxyester sind bereits von verschiedenen NSAIDs wie z.B. Naproxen, Ibuprofen, Ketoprofen, Diclofenac aber auch Flurbiprofen in der Literatur beschrieben. Dabei wurden verschiedene Synthesewege beschritten, von denen einige in Abb. 2.147 zusammengefaßt sind und von jeweils einer der folgenden Verbindungsklassen ausgehen:

- Diol (**103**) z.B. 1,4-Butandiol
- Nitrooxyalkanol (**104**, **105**) z.B. 4-Nitroxybutan-1-ol
- Dihalogenalkan (**107**) z.B. 1-Brom-4-Chlorbutan oder 1,4-Dibrombutan
- Halogenalkanol (**106**) z.B. 4-Brombutan-1-ol
- Halogenalkylnitrat (**102**) z.B. 2-Bromoethylnitrat

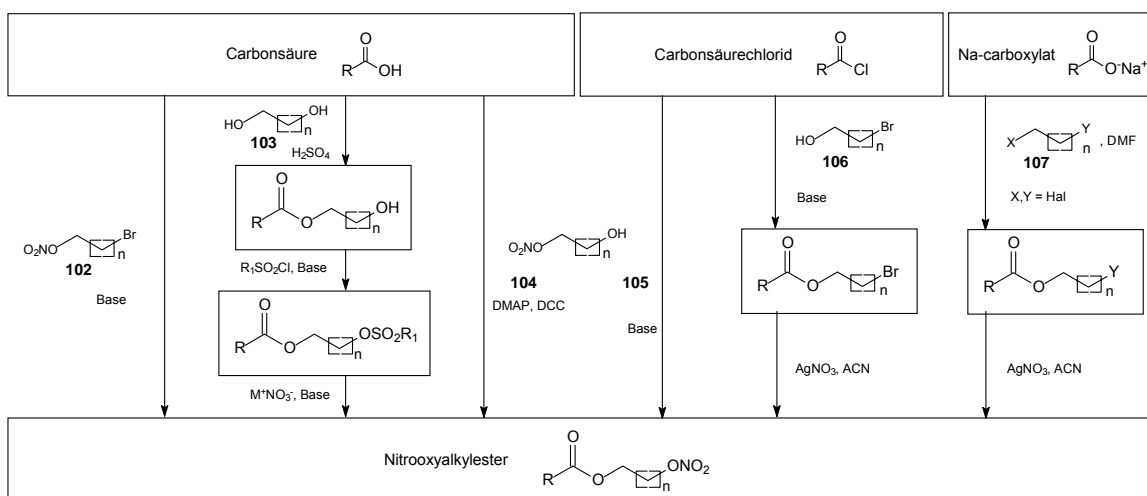


Abb. 2.147: Synthesemöglichkeiten der Nitrooxyalkylester von NSAIDs

Benedini *et al.* [2001] zeigten Synthesewege für Nitrooxyalkylester des S-Naproxen mit einer Enantiomerenreinheit von mehr als 97 % auf, in welchen das Säurechlorid des Naproxen mit Nitrooxyalkanolen (**105**) (z.B. 4-Nitrooxybutan-1-ol) in einem inerten Lösungsmittel (wie z.B. Toluol, Dichlormethan) reagiert. Dabei wurden unterschiedliche Reaktionsbedingungen wie Lösungsmittel und Basenauswahl gegenübergestellt. Ausgehend vom 4-Nitrooxybutan-1-ol kann der 4-Nitrooxybutylester nach Benedini *et al.* auch durch Umsetzung mit Naproxen unter Anwesenheit von DMAP und DCC in 85%iger Ausbeute durchgeführt werden (**104**).

Umständlicher und mit geringerer Ausbeute synthetisierten Andersson *et al.* [2004] den Nitrooxypropylester des Ketoprofen über drei Stufen ausgehend von 1,3-Propandiol, welches zunächst mit Ketoprofen unter Zusatz katalytischer Mengen konz. Schwefelsäure in Toluol verestert wurde (**103**). Der entstandene Hydroxyester konnte anschließend mit Methansulfonylchlorid in das Methansulfonat überführt werden, welches im letzten Schritt mit Lithiumnitrat in *N*-Methylpyrrolidinon in 36%iger Ausbeute zum Nitrooxyester reagierte. Der Einsatz von Alkalimetallnitraten war wesentlich günstiger als die kostspielige Substitution von Sulfonatestern mit Tetrabutylammoniumnitraten, wie sie z.B. von Cainelli *et al.* [1985, 1987] vorgeschlagen wurde. Belli *et al.* [2003] synthetisierten den Nitrooxybutylester von Naproxen u.a. auf dem oben beschriebenen Weg allerdings unter verschiedenen Reaktionsbedingungen und wesentlich aufwendigeren Aufreinigungsschritten. Weiterhin werden in diesem Patent auch andere Darstellungsmöglichkeiten dieser Verbindung mit einer Sulfonatzwischenstufe als gemeinsames Prinzip beschrieben.

Neben den Diolen und Nitrooxyalkanolen können auch Dihalogenalkane (**107**) zur Synthese von Nitrooxyalkylestern von NSAIDs herangezogen werden. So verwendete bereits in den 90er Jahren Del Soldato [1995] 1-Brom-4-Chlorbutan zur Darstellung des 4-Nitrooxybutylesters von Naproxen. Dabei wurde zunächst das Natrium-Salz des Naproxen durch Umsetzung mit Natriumethanolat in Ethanol erhalten, welches anschließend weiter mit 1-Brom-4-Chlorbutan in DMF reagierte. Die dadurch entstandene 4-Chlorbutylverbindung konnte mit Silbernitrat in Acetonitril in den Nitrooxybutylester überführt werden. Auf exakt demselben Weg erhielten Matji *et al.* [1994] den Nitrooxybutylester des Diclofenac. Im Unterschied zu Del Soldato verwendete Arena [Arena, 1994] 1,4-Dibrombutan und erhielt, ausgehend vom jeweiligen Natriumsalz, die Nitrooxybutylester des Ketoprofens und Flurbiprofens. Die Ausbeuten waren jedoch nicht gut, was auf das gleichzeitige Entstehen eines Diesters als Nebenreaktion zurückzuführen sein könnte. Die Umsetzung mit Silbernitrat ist für die Produktion in größerem Rahmen zudem unwirtschaftlich.

Günstiger erscheint die Verwendung von Halogenalkanolen bzw. Halogenalkylnitraten. Dabei kann der gewünschte Nitrooxyalkylester prinzipiell auf 2 Wegen erhalten werden:

- Veresterung von Halogenalkanol mit dem Säurechlorid des NSAIDs (**106**) und anschließender Substitution des Halogens mit Silbernitrat
- Veresterung des Halogenalkanols mit Salpetersäure und weiterer Umsetzung des erhaltenen Halogenalkylnitrats mit dem NSAID (**102**)

Den ersten Weg (**106**) beschrieben Lolli *et al.* [2001], indem sie das Säurechlorid des Ibuprofens mit 3-Brompropan-1-ol und Pyridin als Base umsetzten und den erhaltenen 3-Brompropylester mit Silbernitrat in Acetonitril in 49%iger Ausbeute in den Nitrooxypropylester überführten. Höhere Ausbeuten von 63,6 % erhielten Jain *et al.* [2004] auf dem zweiten Weg (**102**) bei der Darstellung des Nitrooxyethylesters des Naproxen (analog Abb. 2.148).

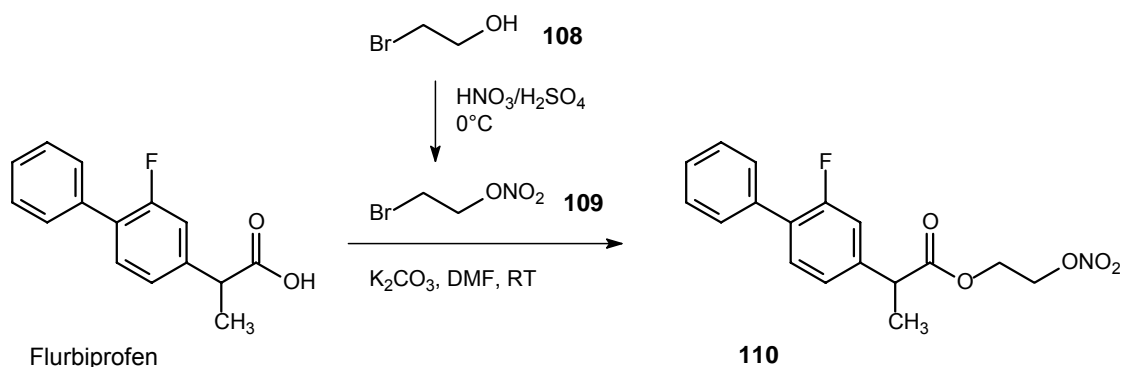


Abb. 2.148: Synthese des Nitrooxyethylesters von Flurbiprofen (**110**)

Auf diesem Wege wurde auch die Verbindung **110** im Rahmen dieser Arbeit synthetisiert. Dazu wurde zunächst entsprechend der Vorschrift von Jain *et al.* [2004] 2-Bromethanol (**108**) mit Nitriersäure bei 0°C verestert. Die in der Literatur angegebene Ausbeute von 76 % konnte allerdings nicht reproduziert, sondern nur 54 % erreicht werden. Im nächsten Schritt wurde das auf diese Weise erhaltene 2-Bromethylnitrat (**109**) mit Flurbiprofen in trockenem DMF in den Nitrooxyethylester **110** überführt. Kaliumcarbonat diente als Base zum Abfangen der bei der Reaktion freiwerdenden Protonen. Im Gegensatz zu der von Jain *et al.* synthetisierten Verbindung fiel jedoch nach der Extraktion mit Hexan im Kühlschrank kein Feststoff aus, so daß eine säulenchromatographische Aufreinigung angeschlossen werden mußte. Diese ergab das Produkt schließlich in 65%iger Ausbeute als oranges Öl.

Aufgrund des chiralen Kohlenstoffs der Methingruppe erhält man für **110** ein relativ kompliziertes ^1H -NMR-Spektrum. Das im Aliphatenbereich am weitesten tieffeldverschobene Multiplett bei 4,61 – 4,75 ppm ist infolge des starken -I-Effektes der Nitratgruppe und der damit einhergehenden Entschirmung der Methylengruppe (2) zuzuordnen, was durch die Integration von 2 H bestätigt wird. Weiter im Hochfeld bei 4,34 bis 4,50 ppm erscheint das Multiplett der anderen Methylengruppe.

Wie schon beim Flurbiprofen beschrieben, resultieren das Quartett bei 3,83 ppm sowie das Dublett bei 1,59 ppm aus der Resonanz des Methin- bzw. der Methylprotonen. Die vicinale Kopplungskonstante von 7,1 Hz sowie die Integrationen von 1 H bzw. 3 H beweisen diese Zuordnung.

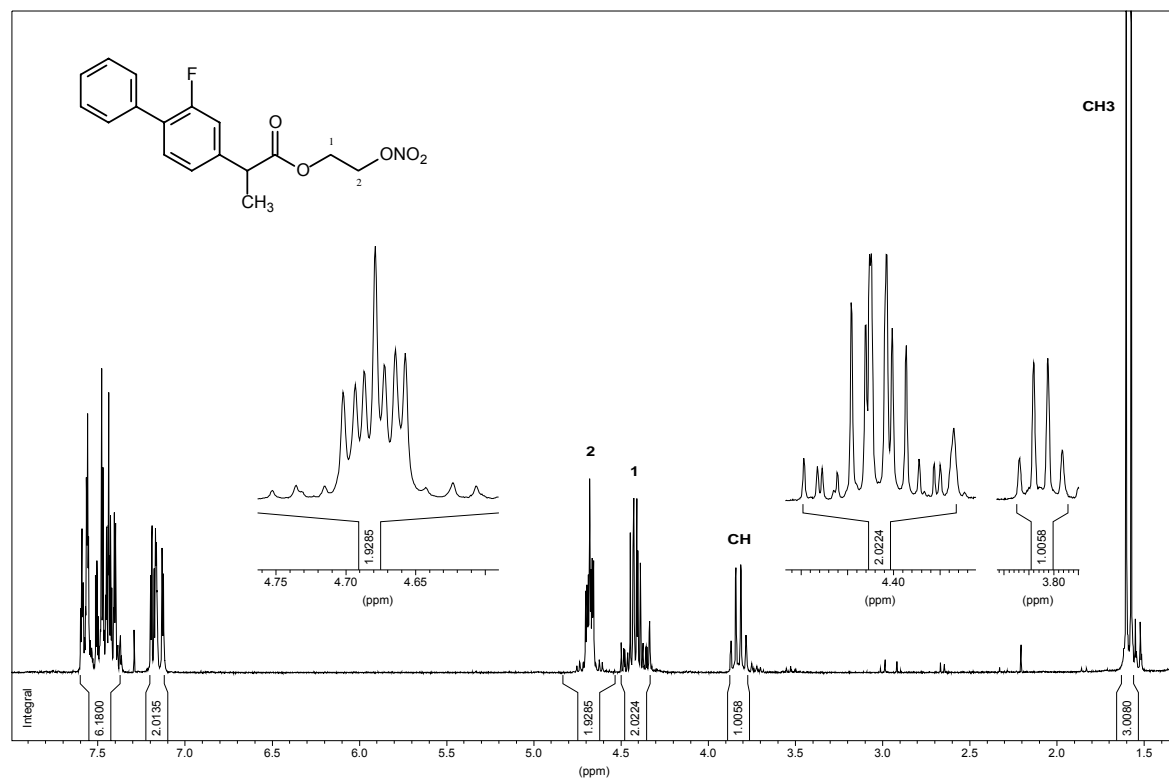


Abb. 2.149: ^1H -NMR von 2-(Nitrooxy)ethyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (CDCl_3) (**110**)

Im ^{13}C -NMR von **110** stimmt der Bereich der aromatischen Kohlenstoffatome in seinem Aufspaltungsmuster mit dem des Flurbiprofen überein. Deutlich sind neben der Methin- und der Methylgruppe die Signale der beiden Methylengruppen bei 60,07 ppm und 70,20 ppm zu erkennen, wobei auch hier das Signal des benachbart zur Nitratgruppe befindlichen Kohlenstoffatoms tieffeldverschoben erscheint.

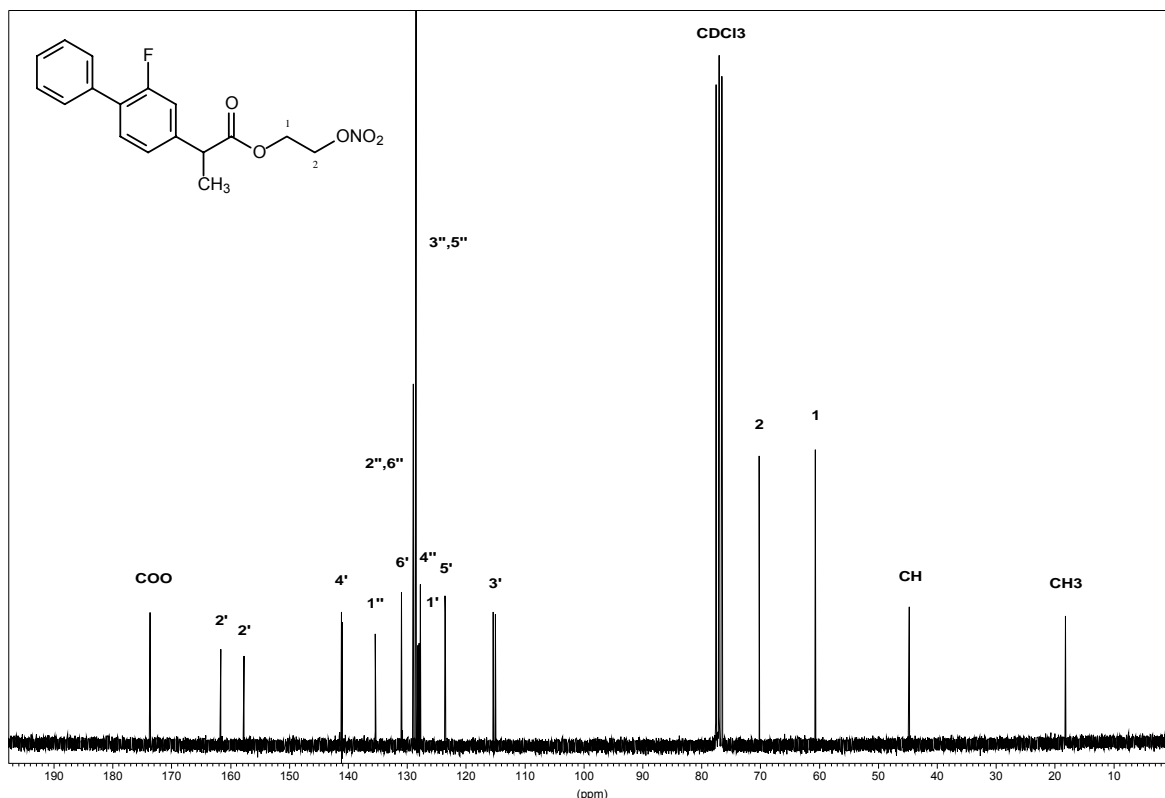
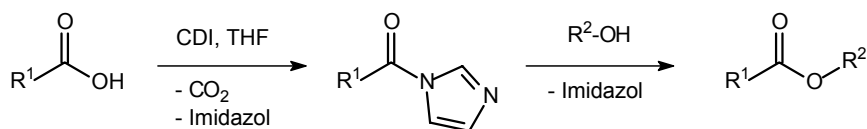


Abb. 2.150: ^{13}C -NMR von 2-(Nitrooxy)ethyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (CDCl_3) (**110**)

2.3.4.2 Synthese von NSAID-Organonitrat-Hybridverbindungen aus Flurbiprofen-derivaten mit PETriN oder Nitratopivalinsäure

Die Verbindungen **111**, **113** und **114** wurden auf demselben Weg dargestellt wie die Hybridsubstanzen aus Flurbiprofen und den aktiven Metaboliten des PETN (s. Kap. 2.3.2), mit dem Unterschied, daß bei diesen Synthesen noch THF anstelle von Acetonitril verwendet worden war. Die Ausbeuten bewegten sich daher wahrscheinlich auch nur im Bereich von 33 – 48 %. Hinzu kommt die Tatsache, daß kein Überschuß von einem der beiden Ausgangsstoffe eingesetzt werden konnte, da in allen Fällen keine großen Mengen an Substanz zur Verfügung standen. Die Synthesen der Edukte **41**, **42** und **4** sind in den Kapiteln 2.1.7, 2.1.8 und 2.1.1 beschrieben.

Die verwendeten Ausgangsstoffe sind in Tab. 2.1 gegenübergestellt, wobei die jeweils eingesetzte Carbonsäure nach Aktivierung mit CDI mit dem jeweiligen Alkohol in trockenem THF bei Raumtemperatur umgesetzt wurde (Mechanismus der Aktivierung s. Kap. 2.3.2). Alle Verbindungen konnten durch Extraktion mit Ether bzw. Dichlormethan und anschließender säulenchromatographischer Aufreinigung mit Ether als Öle erhalten werden.

Abb. 2.151: Syntheseprinzip von **111**, **113** und **114**

Carbonsäure R¹-COOH	Alkohol R²-OH	Produkt	Ausbeute
 41	 6	 111	33 %
 112	 42	 113	48 %
 112	 4	 114	48%

Tab. 2.1: Gegenüberstellung der Edukte und Produkte zur Synthese von **111**, **113** und **114**

Das ^1H -NMR-Spektrum der Zielverbindung **113** zeigt im Vergleich mit den spektralen Daten der Ausgangsverbindung **42** eine geringe Hochfeldverschiebung des NH-Protons um $\Delta\sigma = 0,36$ ppm auf $\sigma = 5,72$ ppm, sowie die Signale der Protonen der Nitratopivalinsäure. Das Signal der OH-Gruppe von **42** bei 2,82 ppm ist nicht mehr zu erkennen.

Die vier Protonen der beiden Methylengruppen des Ethylamids bilden ein ABX_2 -System, dem anhand der Integration insgesamt 4 Protonen zuzuordnen sind. Das als Triplett erscheinende Signal bei einer chemischen Verschiebung von 4,20 ppm repräsentiert die Kopplungen der benachbart zur Esterbindung befindlichen Methylenprotonen (X_2). Die vicinale Kopplungskonstante zu den benachbarten Methylenprotonen an der Amidbindung (A,B) beträgt $^3J = 4,8$ Hz. Letztere wiederum ergeben ein hochfeldverschobenes Multiplett bei 3,47 – 3,54 ppm, welches man als Überlagerung zweier Tripletts interpretieren könnte. Diese könnten sich aufgrund der in CDCl_3 nicht sichtbaren Kopplung zum Amidproton durch alleinige Kopplung zu den zwei Methylenprotonen ergeben, wobei sich die Tripletts infolge einer nur kleinen Verschiebungsdifferenz zu einem Pseudoquartett überlagern würden (s. Abb. 2.152).

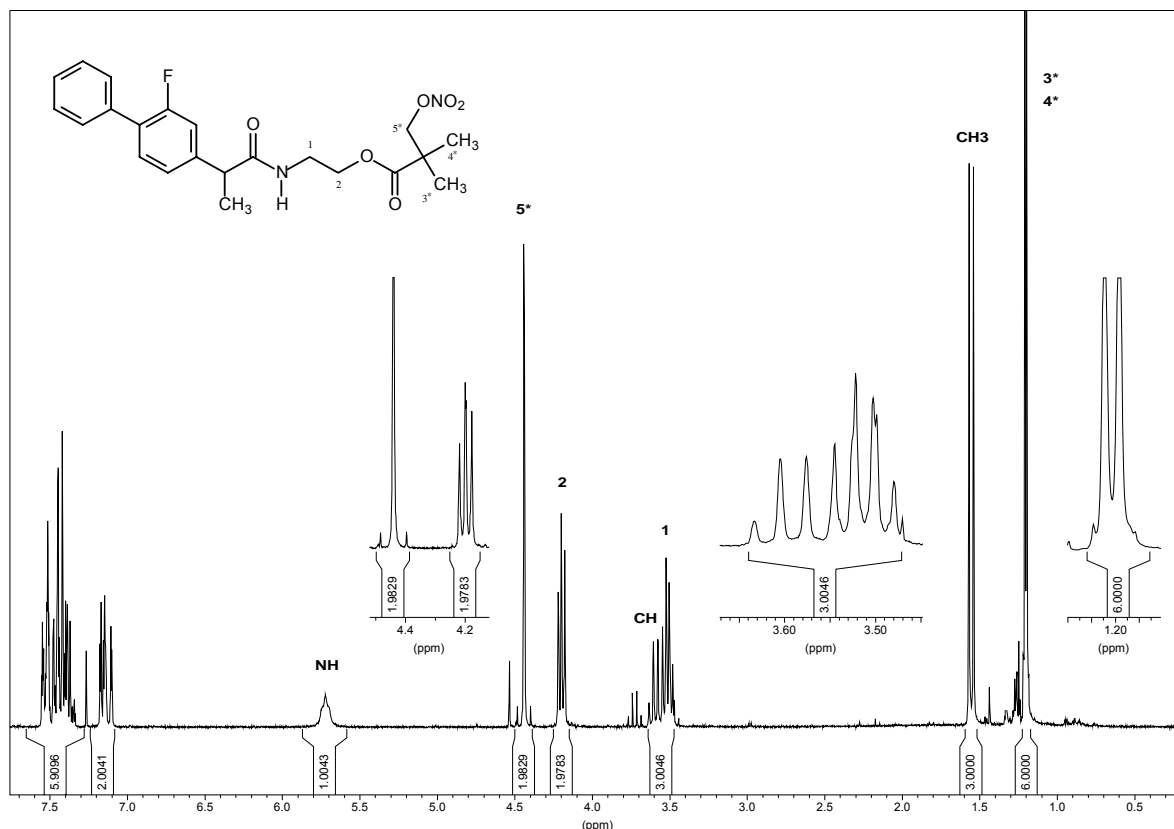


Abb. 2.152: ^1H -NMR von 2-[[[(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]amino]ethyl 2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)propanoat (CDCl_3) (**113**)

Die Hochfeldverschiebung der Signale der Methylenprotonen (1) im Vgl. zu (2) resultiert aus einer höheren Abschirmung der Kerne, da die benachbarte Amidgruppe aufgrund ihres schwächer ausgeprägten $-\text{I}$ -Effektes die Elektronendichte in der Umgebung der Kerne nicht so stark wie die Estergruppe vermindert. Die Resonanz erfolgt daher im höheren Feld, d.h. bei kleineren σ -Werten.

Beim Signal der Methylenprotonen (2) ist ein deutlicher Dacheffekt zum Signal der benachbarten Methylenprotonen (1) zu erkennen.

Aufgrund des stark elektronenziehenden Effekts der Nitratgruppe und einer daraus resultierenden starken Entschirmung erscheint das Signal der benachbarten Methylengruppe am weitesten tieffeldverschoben bei 4,42 – 4,46 ppm. Beide geminalen Protonen sind diastereotop und treten bei geringfügig unterschiedlichen Frequenzen in Resonanz. Die Differenz der chemischen Verschiebungen der beiden entstehenden Dubletts ist allerdings so klein, daß beide fast zu einem Singulett zusammenfallen.

Deutlich sind im Vergleich von Abb. 2.152 mit dem Spektrum der Ausgangsverbindung **42** zwei Singulett bei 1,20 und 1,21 ppm zu erkennen. Diese können anhand der Integration von 6 H den beiden Methylgruppen des Nitratopivalinsäurerestes zugeordnet werden.

Beide Linien stellen jedoch kein Dublett dar, da die Aufspaltung nicht das Resultat einer Kopplung ist. Beide Methylgruppen sind nämlich nicht äquivalent, da sie bei Rotation um die Einfachbindung nicht dieselbe Umgebung überstreichen und somit das magnetische Feld, dem jede Methylgruppe ausgesetzt ist, verschieden ist. Hinzu kommt die Möglichkeit einer eingeschränkten Drehbarkeit durch den sterisch anspruchsvollen Nitrooxymethylenrest am quartären Kohlenstoffatom.

Das Signal der benachbart zum chiralen Methinkohlenstoff liegenden Methylgruppe erscheint bei einer chemischen Verschiebung von 1,56 ppm dazu tieffeldverschoben als Dublett. Aufgrund der Kopplung der Methylprotonen mit dem Methinwasserstoff ist die Multiplizität des entstehenden Signals wie erwartet. Das Quartett des Methinprotons ergibt sich durch Kopplung mit den drei äquivalenten Methylprotonen. Die Kopplungskonstanten beider Signale stimmen überein (7,1 Hz), was die Zuordnung bestätigt. Infolge der großen Ähnlichkeit der chemischen Verschiebungen des Methinprotons und der zur Estergruppe α -ständigen Methylengruppe sind die Spinsysteme beider Gruppen ineinander verschoben.

Die Linienverbreiterung des NH-Signals von **113** bei 5,72 ppm könnte aus einem intermolekularen Austausch der Wasserstoffatome und dadurch aus gemittelten Signalen resultieren, so daß eine Kopplungskonstante zu vicinalständigen Protonen nicht bestimmt werden kann (s. Abb. 2.152).

Beim Vergleich der Spektren der Ausgangsverbindung **41** (in D_6 -DMSO) und **111** (in $CDCl_3$) fällt auf, daß sie im Bezug auf das Signalmuster der aromatischen Protonen und der Methylprotonen übereinstimmen, geringe Unterschiede in den chemischen Verschiebungen ergeben sich aufgrund unterschiedlicher Lösungsmittel.

Zusätzlich erkennt man jedoch im 1H -NMR-Spektrum von **111** (s. Abb. 2.153) ein im tieferen Feld bei 4,55 ppm liegendes Singulett, welches anhand der Integration den sechs Nitrooxymethylenprotonen zu geordnet werden kann. Aufgrund der stärkeren elektronenziehenden Effekte der Nitratgruppen und der damit verbundenen Entschirmung der Wasserstoffkerne erscheint dieses Signal im tieferen Feld bei größeren σ -werten als die Methylenprotonen benachbart zur Estergruppierung am PETriN-Rest. Letztere ergeben ein Singulett bei 4,30 ppm, da der Einfluß des entfernten, chiralen Kohlenstoffatoms im Flurbipropenteil zu gering ist um eine Aufspaltung des Signals wie z.B. bei **14** zu bewirken (s. Kap. 2.3.2).

Die chemischen Verschiebungen der Nitrooxymethylenprotonen des PETriN-Restes sind jedoch mit denen von **14** vergleichbar (4,39 ppm in $CDCl_3$).

Im Gegensatz dazu resultiert aus der Nähe des chiralen Methinkohlenstoffs und der Nachbarschaft der Ester- und Amidgruppen ein Signal höherer Komplexität für die Methylengruppe des Glycinlinkers. Beide Wasserstoffatome sind diastereotop und erscheinen bei geringfügig unterschiedlichen chemischen Verschiebungen von 3,96 - 4,02 ppm bzw. 4,03 – 4,09 ppm, was eine Überlagerung der für jedes Proton entstehenden Doppeldoublets zur Folge hat. Die Protonen koppeln dabei untereinander mit einer geminalen Kopplungskonstante von $^2J = 18,0$ Hz, eine vicinale Kopplung von $^3J = 5,6$ Hz ergibt sich zum Proton der Amidgruppe. Das Triplett des Amidprotons erscheint zentriert bei 5,97 ppm.

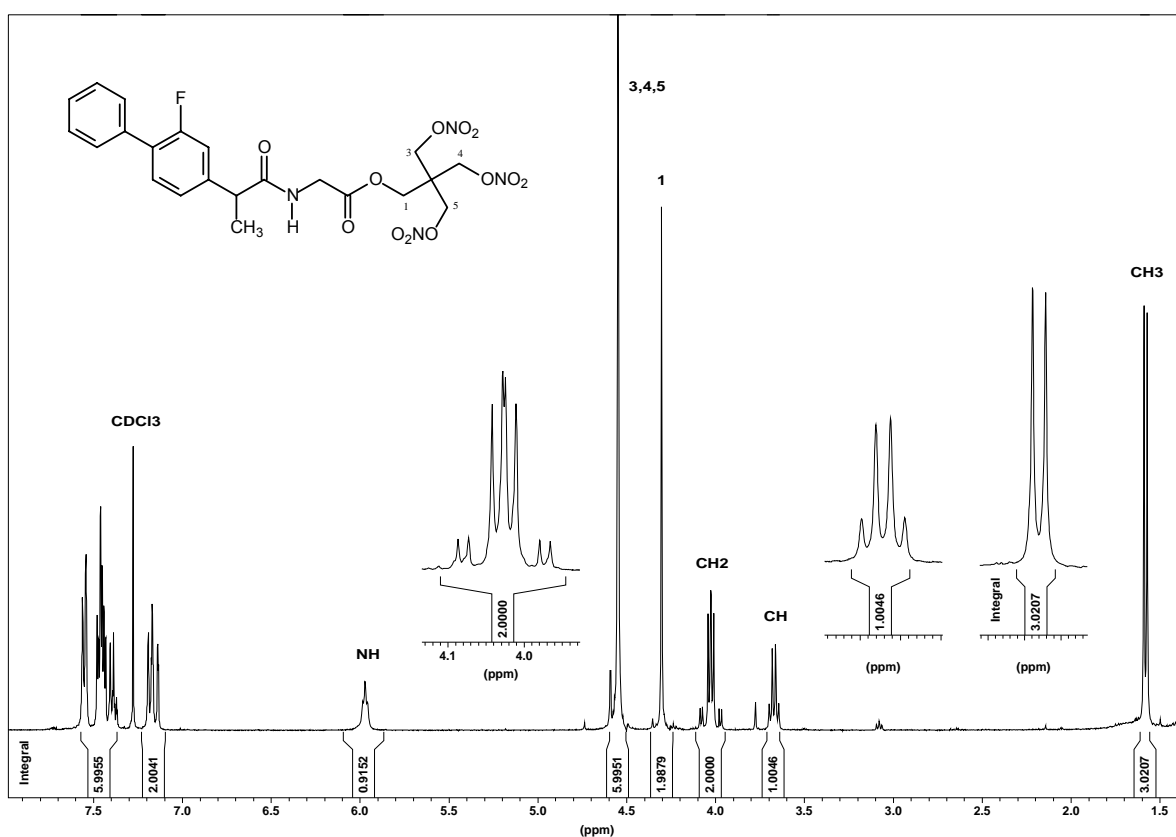


Abb. 2.153: $^1\text{H-NMR}$ von 3-(Nitrooxy)-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl N-[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]glycinat (CDCl_3) (**111**)

Im $^{13}\text{C-NMR}$ von **111** erscheint der Methylenkohlenstoff des Glycinlinkers bei 41,53 ppm am weitesten im Hochfeld, die Methylenkohlenstoffe benachbart zu den Nitratgruppen dazu dagegen stark tieffeldverschoben bei 69,08 ppm. Der quartäre Kohlenstoff des PETriN-Restes zeigt eine chemische Verschiebung von 42,26 ppm. Die Zuordnung der Signale wurde mit Hilfe eines DEPT-Spektrums abgesichert.

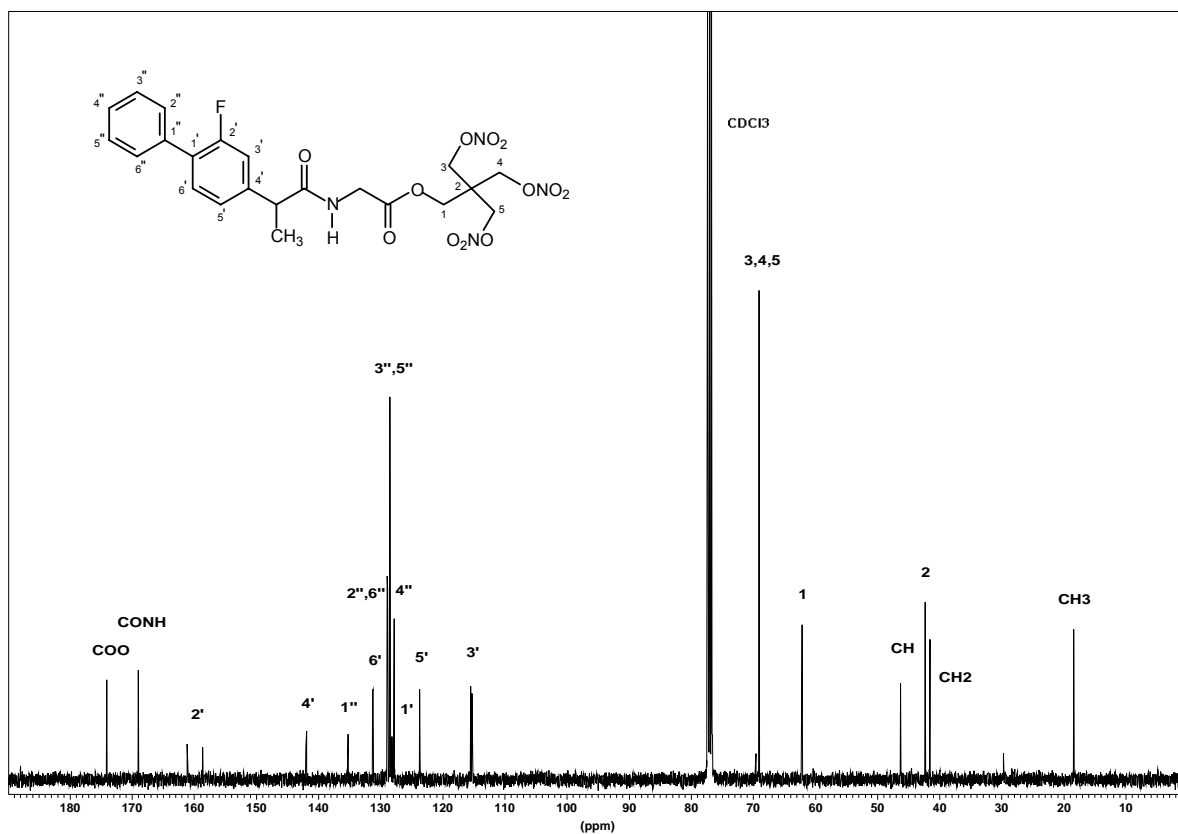


Abb. 2.154: ^{13}C -NMR von 3-(Nitrooxy)-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl N-[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]glycinat (CDCl_3) (111)

3. Pharmakologischer Teil

Die Auswahl der Testsubstanzen erfolgte unter dem Gesichtspunkt eine möglichst große Zahl von Derivaten mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen zu erfassen.

3.1 Testung auf A β -senkende Wirkung

Die Bestimmung der A β -senkenden Wirkung einiger ausgesuchter Verbindungen wurde freundlicherweise von Eva Czirr aus dem Arbeitskreis von Prof. Dr. Sascha Weggen an der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit den zu testenden Verbindungen behandelt und anschließend die Menge des gebildeten A β_{40} und A β_{42} im Nährmedium mittels Sandwich-ELISA bestimmt [Weggen, 2001].

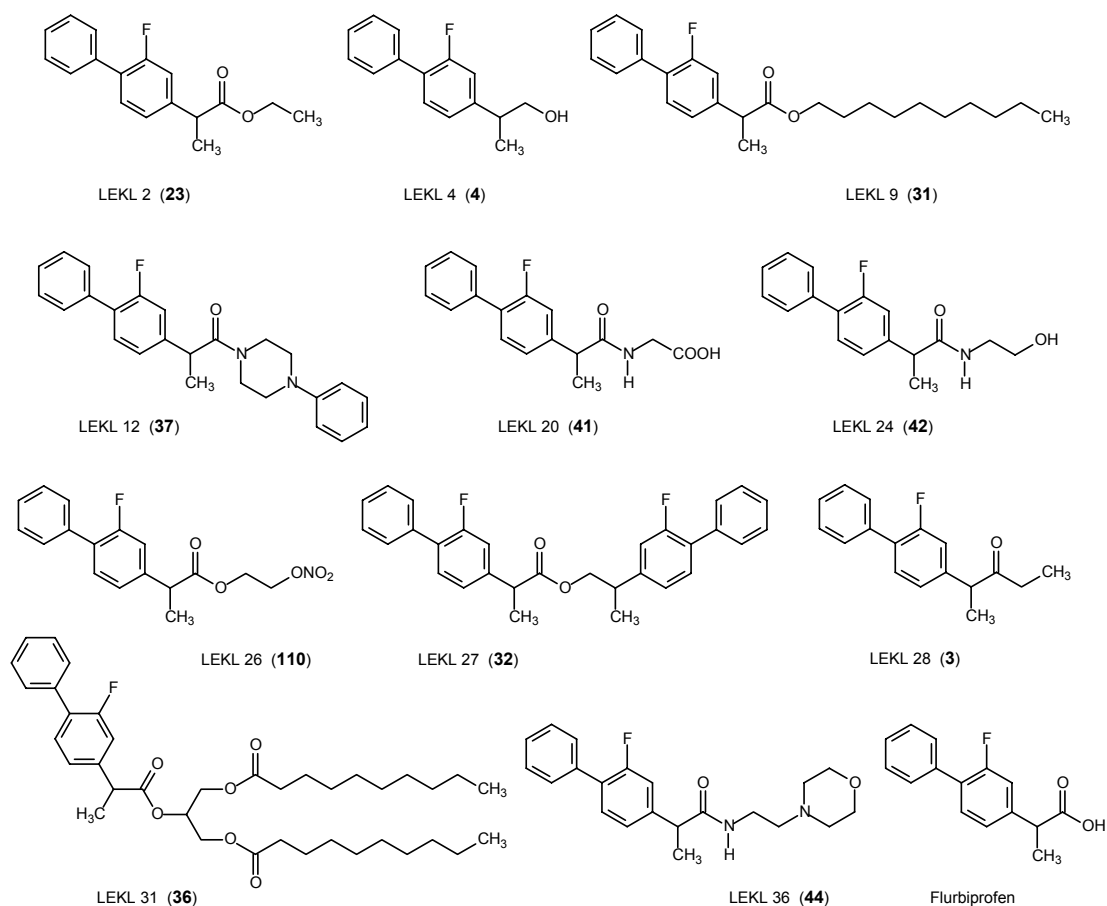


Abb. 3.1: Übersicht der auf A β -senkende Wirkung getesteten Flurbiprofen-Derivate

3.1.1 Methodenbeschreibung

3.1.1.1 Zellkultur und Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen

Die Versuche nach Weggen *et al.* [2001] wurden an Zellen der CHO-Zelllinie 7WD10 durchgeführt, die APP₇₅₁ und Presenilin mit der M146L Mutation stabil überexprimiert. Die

Nährlösung bestand aus DMEM-Medium, versetzt mit 10% FKS und 100 U ml^{-1} Penicillin/Streptomycin. Zur Analyse der A β -Sekretion wurden die Zellen im serumhaltigen Medium kultiviert und über Nacht mit den jeweiligen Testsubstanzen vorbehandelt. Nach Wechsel des Nährmediums erfolgte eine wiederholte Behandlung über weitere 24 Stunden. Die Versuche wurden 2-4-mal im Duplikat bzw. Triplikat wiederholt. Alle Verbindungen wurden so weit möglich zunächst als 200 mM Stammlösung in DMSO gelöst. Als Kontrollsubstanzen dienten Flurbiprofen und der γ -Sekretase-Inhibitor L685,458. Die Konzentration aller Substanzen für den initialen Test lag bei 200 μM , mit Ausnahme des γ -Sekretase-Inhibitors, welcher 2,5 μM eingesetzt wurde. Die Substanzen LEKL 24 (**42**) und LEKL 36 (**44**) wurden in Konzentrationen von 50 μM , 100 μM und 200 μM noch einmal nachgetestet.

3.1.1.2 Sandwich-ELISA zur Bestimmung der A β -Sekretion

Der Sandwich-ELISA wurde wie bei Murphy *et al.* [2000] beschrieben, durchgeführt. Dazu wurde das Nährmedium nach 24 Stunden gesammelt und die Zelltrümmer mittels Zentrifugation abgetrennt. Nach Zusatz von „Complete protease inhibitor cocktail“ [Firma Roche, D-79639 Grenzach-Wyhlen] konnten A β_{40} und A β_{42} unter Verwendung von BAN50/BA27 und BAN50/BC05 ELISAs bzw. 3160/BA27 und 3160/BC05 ELISAs quantifiziert werden. Die Versuche wurden jeweils im Duplikat durchgeführt.

3.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Die in zwei Testreihen erhaltenen Ergebnisse sind in den Abb. 3.2 und 3.3 dargestellt.

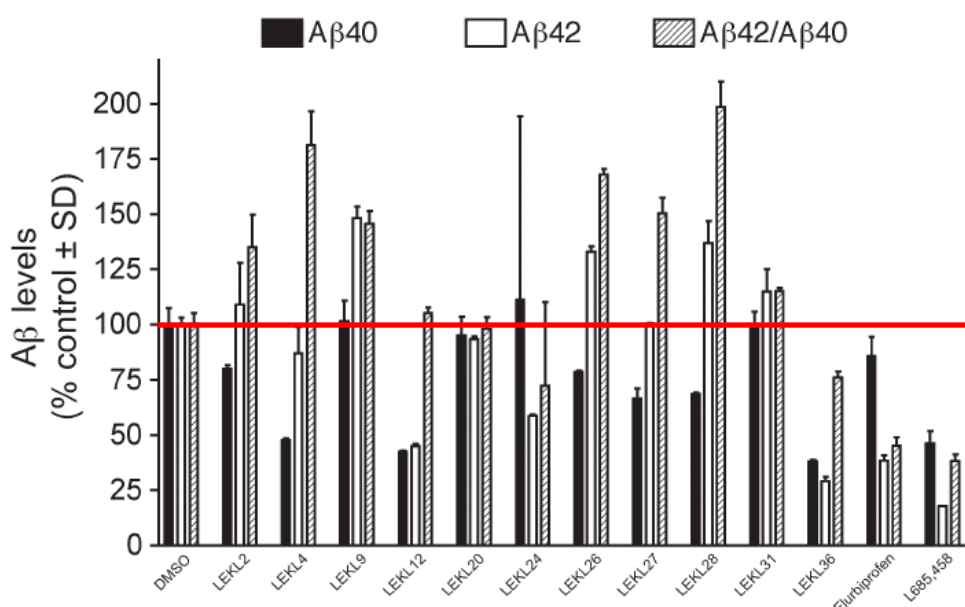


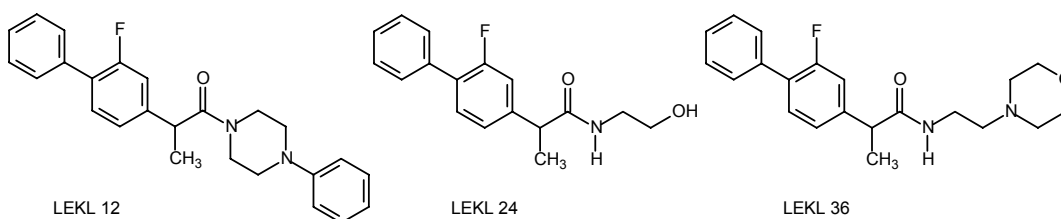
Abb. 3.2: Ergebnisse der Testreihe 1 zur Bestimmung der A β_{40} - und A β_{42} -Bildung

Im Falle des unspezifischen γ -Sekretase-Inhibitors L685,458 ist in Abb. 3.2 eine deutliche Reduktion der $A\beta_{42}$ -Bildung um etwa 80 % im Vergleich zur Kontrolle DMSO festzustellen. Auch die Behandlung der Zellen mit dem nicht-steroidalen Antiphlogistikum Flurbiprofen führte zu einer etwa 65 % geringeren $A\beta_{42}$ -Bildung, wobei im Unterschied zum γ -Sekretase-Inhibitor beim NSAID eine stärker selektive Hemmung von $A\beta_{42}$ im Vergleich zu $A\beta_{40}$ beobachtet wurde. Die $A\beta_{40}$ -Konzentration war bei Flurbiprofen fast unverändert und bewegte sich zwischen 80 % und 90 % der Kontrolle. Bei Behandlung der Zellen sowohl mit dem γ -Sekretase-Inhibitor L685,458 als auch mit Flurbiprofen wurden keinerlei Anzeichen einer toxischen Wirkung der Verbindungen beobachtet.

Die Verbindung LEKL 20 zeigte im Vergleich zur Kontrolle DMSO weder eine Veränderung in der $A\beta_{42}$ -, noch in der $A\beta_{40}$ -Bildung.

Bei LEKL 2, LEKL 9, LEKL 26, LEKL 28 und LEKL 31 war dagegen im Vergleich zur Kontrolle eine Erhöhung der $A\beta_{42}$ -Bildung festzustellen, welche bei LEKL 31 und LEKL 2 jedoch nicht signifikant war. Eine signifikante Steigerung der $A\beta_{42}$ -Bildung um fast 50 % zeigte LEKL 9 bei unveränderter $A\beta_{40}$ -Produktion. LEKL 26 und LEKL 28 führten bei Senkung der $A\beta_{40}$ -Bildung um 20 - 30% ebenfalls zu einer starken Erhöhung von $A\beta_{42}$ um etwa 40 %. Es konnte jedoch beobachtet werden, daß es nach der Behandlung der Zellen mit diesen Substanzen und zusätzlich auch bei LEKL 27 zu einer Tröpfchenbildung im Zellkulturmedium kam, die auch nach 24 Stunden noch erkennbar war. Dies deutet auf Löslichkeitsprobleme der Substanzen im Nährmedium hin, welche zu einer Präzipitation und damit Entzug der Verbindungen aus dem Versuchsansatz geführt haben könnten. Die mit diesen drei Substanzen gewonnenen Ergebnisse sind daher vorsichtig zu beurteilen. Eine toxische Wirkung der Verbindungen wurde nicht beobachtet.

Eine starke Senkung der $A\beta_{42}$ -Bildung wurde in Testreihe 1 bei den Verbindungen LEKL 12, LEKL 24 und LEKL 36 im Bereich zwischen 60 % und 70 % der Kontrolle ermittelt, jedoch war die Hemmung nicht selektiv für $A\beta_{42}$, die $A\beta_{40}$ -Level waren ebenfalls betroffen. Für LEKL 24 lassen sich zur $A\beta_{40}$ -Bildung aufgrund des großen Fehlers keine sicheren Aussagen treffen.



Die Zellen, die mit LEKL 36 behandelt wurden, zeigten ein normales Erscheinungsbild, die mit LEKL 12 behandelten jedoch eine veränderte Morphologie, bei welcher man eventuell toxische Effekte als Ursache vermuten könnte. Bei der Verbindung LEKL 24 wurden sogar viele tote Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Bei starker Toxizität kann über die Wirkung auf die A β ₄₀- bzw. A β ₄₂-Bildung keine Aussage mehr getroffen werden. Die Substanzen wurden daher als potenziell inaktiv eingestuft.

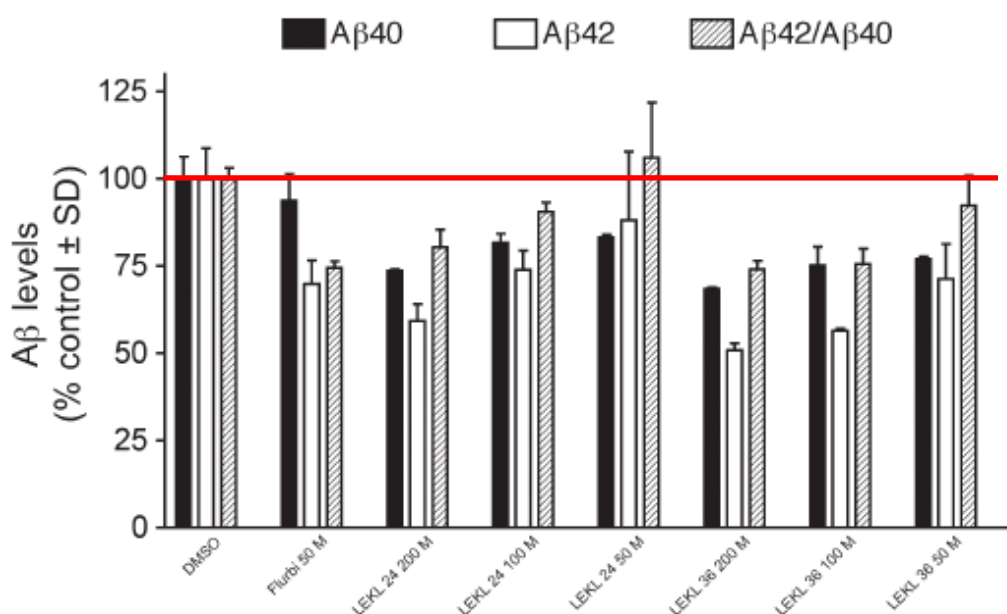


Abb. 3.3: Ergebnisse der Testreihe 2 zur Bestimmung der A β ₄₀- und A β ₄₂-Bildung nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen LEKL 24 und LEKL 36

Aufgrund der in Testreihe 1 erhaltenen Ergebnisse wurde entschieden, die Verbindungen LEKL 36 und LEKL 24 noch einmal in abgestuften Konzentrationen von 50, 100 und 200 μ M gegen DMSO und Flurbiprofen (50 μ M) zu testen. Die hier bei beiden Substanzen beobachtete Zelltoxizität war im Falle von LEKL 24 stärker ausgeprägt als bei LEKL 36. Die in Abb. 3.3 erkennbare dosisabhängige Abnahme der A β ₄₂-Konzentration könnte daher auch auf diese toxischen Effekte zurückzuführen sein.

Zusammenfassend muß man sagen, daß alle getesteten Verbindungen unter genannten Testbedingungen als nicht günstig zur Inhibition der γ -Sekretase und damit der A β ₄₂-Bildung einzustufen sind. Toxizität und Löslichkeitsprobleme können als mögliche Ursache gesehen werden. Zudem äußerten Schmidt *et al.* [2006] die Vermutung, daß die Carbonsäurefunktion grundsätzlich erforderlich ist und ein lipophiler Substituent am aromatischen Ringsystem die Aktivität an der γ -Sekretase maßgeblich erhöht. Auch Peretto *et al.* [2005] konnten feststellen, daß, abgesehen von Flurbiprofenamid, alle Ester- und Amid-Derivate des Flurbiprofen eine insgesamt geringere A β ₄₂-Inhibition zeigten, z.T.

konnte sogar eine Erhöhung der $A\beta_{42}$ -Produktion beobachtet werden. Eine solche selektive Erhöhung durch chemische Modifikationen an der COOH-Gruppe bestätigten auch andere Autoren wie Kukar *et al.* [2005]. Daraus kann man schlußfolgern, daß $A\beta_{42}$ -vermindernde NSAIDs wie Indometacin oder Flurbiprofen durch Derivatisierung an der Säurefunktion in $A\beta_{42}$ -steigernde Verbindungen überführt werden können [Czirr, 2006].

Da mit Ausnahme der Verbindung LEKL 20, alle im Rahmen dieser Versuche getesteten Substanzen entweder Ester oder Amide des Flurbiprofens darstellten, die keine freie Säuregruppe mehr aufwiesen, könnte die fehlende $A\beta_{42}$ -senkende bzw. die sogar $A\beta_{42}$ -steigernde Wirkung darauf zurückzuführen sein.

Die Verbindungen wurden jedoch alle schon in den Jahren vor den Ergebnissen dieser Autoren synthetisiert. Nach den mittlerweile gewonnenen Erkenntnissen wäre es günstig gewesen bzgl. des Syntheseziels eine Substitution an der Carboxylgruppe zu vermeiden.

3.2 Bestimmung der COX-1- und COX-2-Inhibition

Die Untersuchungen zur Hemmung der Cyclooxygenase 1 und 2 (COX-1 und -2) sowie der 5-Lipoxygenase (5-LOX) wurden freundlicherweise von Dr. Petra Froberg und ihren Mitarbeitern an der Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg durchgeführt.

Cyclooxygenase- und Lipoxygenase-Isoformen sind wichtige Enzyme des Arachidonsäure-Metabolismus, welcher an der Bildung von entzündungsfördernden Eicosanoiden beteiligt ist. In den durchgeführten Versuchen erfolgte die Bestimmung der Enzymaktivität über die Quantifizierung der Metaboliten.

Die jeweiligen Effekte der Testverbindungen auf COX-1 wurden anhand der Bildung von 12-Hydroxy-5,8,10-heptatriensäure (12-HHT), die Effekte auf 5-LOX mittels 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) und Leukotrien B₄ (LTB₄) kontrolliert. Zusätzlich wurden 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) und 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) als Hauptmetaboliten von 12-LOX und 15-LOX untersucht (s. Abb. 3.4).

Die Eicosanoid-Biosynthese wurde im humanen Vollblutassay unter Verwendung von HPLC mit UV-Detektion entsprechend Froberg *et al.* [2006] überwacht.

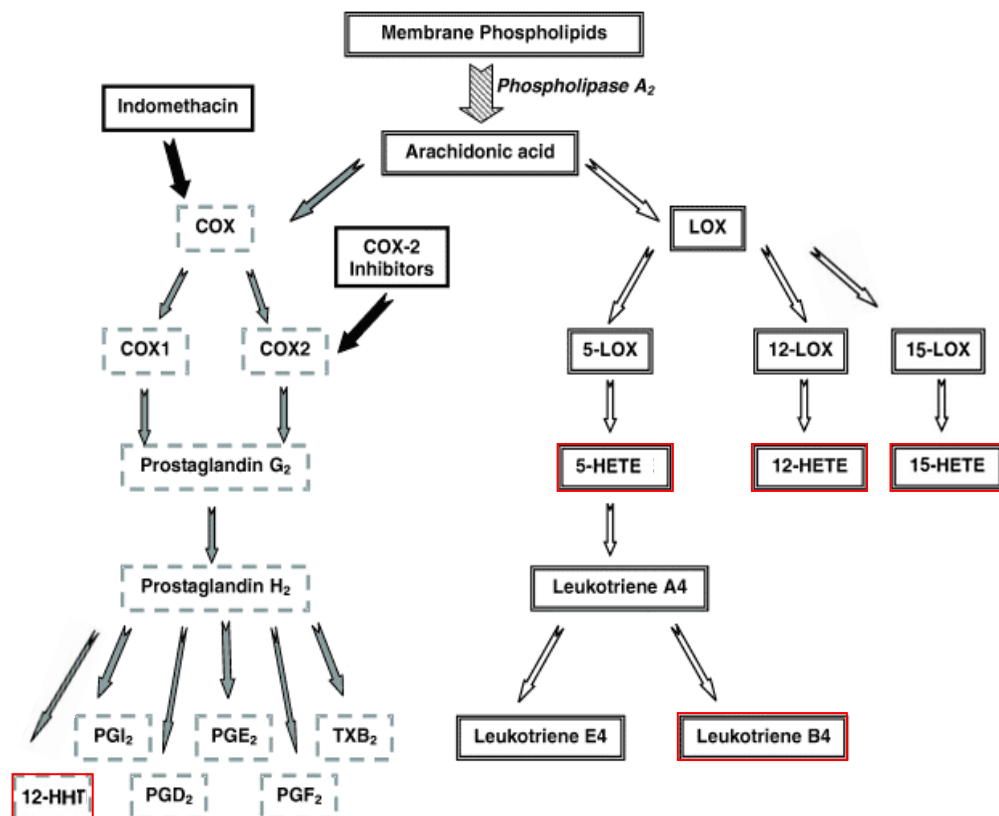


Abb. 3.4: Arachidonsäurekaskade [Abb. modifiziert nach [Inta 24]

Die zu testenden Verbindungen sind in Abb. 3.5 dargestellt:

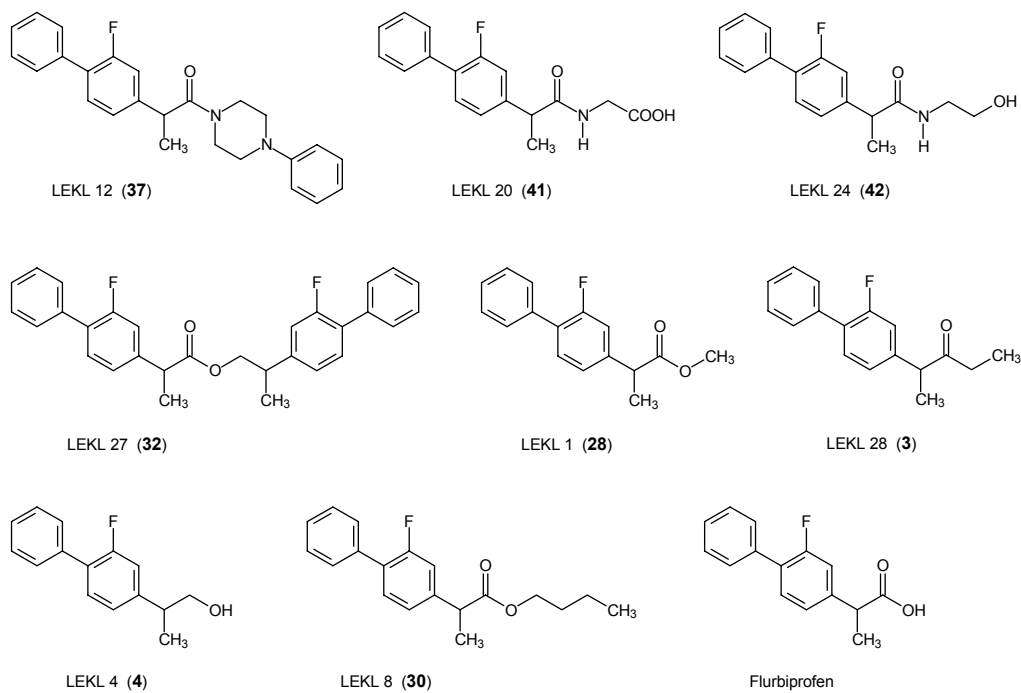


Abb. 3.5: Übersicht der getesteten Flurbiprofen-Derivate

3.2.1 Methodenbeschreibung

3.2.1.1 Vollbluttestung COX-1- Assay

Die Durchführung des humanen *in vitro* Vollblutassays für COX-1 erfolgte wie in Froberg *et al.* [2006] beschrieben. Dazu wurde frisch entnommenes, heparinisiertes Blut gesunder Probanden (3 ml pro Bestimmung) bei 37°C im Wasserbad für 30 min mit den Testsubstanzen inkubiert, welche zunächst in 6 µl DMSO gelöst worden waren und während des Versuches in einer Endkonzentration 10 µM in DMSO eingesetzt wurden. Die Kontrolle bestand aus 6 µl DMSO ohne Zusatz einer Testsubstanz. Die Eicosanoid-Bildung wurde eingeleitet durch Zugabe von Ca-Ionophor A23187 (30 µM), Arachidonsäure (10 µM), Calciumchlorid und Magnesiumchlorid (in einer Endkonzentration von jeweils 0,5 mM). Der Abbruch der Enzymreaktion nach weiteren 40 min Inkubation bei 37°C im Wasserbad erfolgte durch Zusatz von 0,5 ml eisgekühltem Methanol, welches PGB₁ als internen Standard für die HPLC enthielt. Anschließend wurden die Blutproben zur Sicherstellung eines vollständigen Abbruchs aller Reaktionen 90 min bei -18°C aufbewahrt und nach Zusatz von 4 ml Wasser, eine Zentrifugation bei 2000g und Festphasenextraktion der Eicosanoide an Bakerbond SPE C-18 Säulen durchgeführt. Die Retentionszeiten der einzelnen Metaboliten wurden jeweils im Vorfeld mit kommerziell erhältlichen Referenzsubstanzen bestimmt. Die in den Proben enthaltenen Metaboliten LTB₄, 15-HETE, 12-HETE, 5-HETE und 12-HHT konnten anschließend in Ethanol mittels HPLC an einer RP-18-Säule unter Verwendung eines Gemisches aus Methanol/Wasser/Essigsäure (77/23/0,01 [V/V/V]) als Fließmittel und UV-Detektion mit einem Diodenarray-Detektor quantifiziert werden. Die Ergebnisse sind jeweils Mittelwerte aus 3 Versuchen. Signifikante Unterschiede im Vollbluttest mit den Testsubstanzen und Kontrollen wurden mittels *t*-Test analysiert. Bei $P < 0,05$ wurden die Werte als signifikant eingestuft.

3.2.1.2 Vollbluttestung COX-2 – Assay

Die Durchführung des Assays erfolgte in ähnlicher Weise wie unter 3.2.1.1 beschrieben, mit dem Unterschied, daß die Blutproben vor der Inkubation mit den Testsubstanzen 30 min bei 37°C im Wasserbad mit je 6 µl ASS-Lösung in einer Endkonzentration von 0,1 mM vorinkubiert wurden. Nach Zusatz der in DMSO gelösten Testsubstanzen bzw. Blindproben wurde auch hier eine Inkubationszeit von 30 Minuten angeschlossen. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Ca-Ionophor A23187 (30 µM), Arachidonsäure (10 µM), Calciumchlorid und Magnesiumchlorid (in einer Endkonzentration von jeweils 0,5 mM), aber abweichend von 3.2.1.1 noch zusätzlich mit LPS-Lösung (30 µg pro 3 ml

Probe) gestartet. Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C im Wasserbad erfolgte auch hier der Abbruch der Enzymreaktion mit 0,5 ml eisgekühltem Methanol, welches PGB₁ als internen Standard für die HPLC enthielt. Nach einer Aufbewahrungszeit der Proben von mindestens einer Stunde im Gefrierschrank bei -18°C wurde eine Festphasenextraktion und HPLC-Bestimmung in analoger Weise zu 3.2.1.1 angeschlossen.

Bei beiden Testverfahren erfolgte die Bildung der Arachidonsäurederivate erst nach Zugabe bestimmter Stimulantien, die in der Lage sind, die Enzyme, die für die Bildung der Metaboliten aus Arachidonsäure verantwortlich sind, zu aktivieren [Heinrichs, 2006]. Beim COX-1-Assay wurde zu diesem Zweck Calcium-Ionophor A23187 (Calcimycin), ein Antibiotikum aus *Streptomyces chartreusis*, verwendet. Aus der Öffnung von Calcium-Kanälen in der Zellmembran resultiert eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration, welche wiederum zu einer Aktivierung Calcium-abhängiger Enzyme der Arachidonsäurekaskade führt [Frohberg, 2006].

Beim COX-2-Assay wurde noch eine zusätzliche Stimulierung mit bakteriellen Endotoxinen, in diesem Falle Lipopolysacchariden (LPS) von *E. coli*, erreicht. Der Zusatz von LPS leitet verstärkt Entzündungsprozesse ein, die wiederum zu einer verstärkten Expression der COX-2 führen. Maximale Level an COX-2 mRNA werden daher erst nach etwa acht Stunden erreicht, so daß aus diesem Grunde eine längere Inkubationszeit von 24 Stunden im Vorfeld der Bestimmung der Metaboliten (z.B. 12-HHT) gewählt wurde [Heinrichs, 2006].

Für die Aktivierung der Enzyme sind weiterhin Calcium- und Magnesiumionen notwendig. Ein Mangel an freier Arachidonsäure im Vollblut, wird durch Zusatz einer Arachidonsäure-Lösung ausgeglichen.

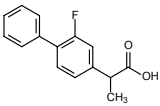
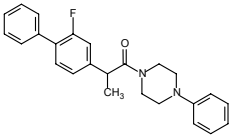
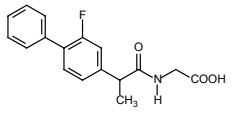
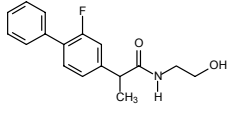
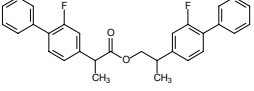
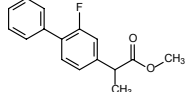
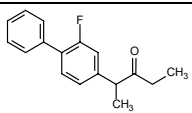
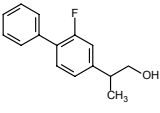
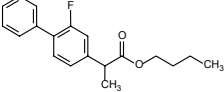
Eine Zugabe von ASS erfolgte vor dem Hintergrund, daß zur Bestimmung der COX-2-Aktivität zunächst eine Hemmung der COX-1 stattfinden muß, was ASS durch irreversible Acetylierung eines Serin-Restes in der Nähe des katalytischen Zentrums der COX-1 erreicht.

3.2.2 Ergebnisse und Diskussion

3.2.2.1 COX-1-Assay

Wie aus Abb. 3.6 und Tab. 3.1 hervorgeht, zeigten alle getesteten Verbindungen in Konzentrationen von 10 µM entweder keine Hemmung oder lediglich eine Inhibition der Metabolitbildung über die LOX-Kaskade von unter 50 % und sind daher als nicht ausreichend aktiv einzustufen.

Anhand der Bestimmung der 12-HHT konnte bei den Verbindungen LEKL 12 und LEKL 20 ferner keine Hemmung der COX-1 festgestellt werden. Eine vergleichsweise geringe und nicht signifikante Hemmung der COX-1 zeigten LEKL 27 und LEKL 28 (37 % bzw. 48 %).

Inhibitor	Strukturformel	Hemmung LTB ₄	Hemmung 5-HETE	Hemmung 12-HETE	Hemmung 15-HETE	Hemmung 12-HHT
Flurbi- profen		41 ± 17	k.H.	28 ± 39	k.H.	94* ± 6
LEKL 12		k.H.	k.H.	k.H.	k.H.	26 ± 7
LEKL 20		k.H.	18 ± 14	6 ± 12	k.H.	k.H.
LEKL 24		k.H.	k.H.	k.H.	k.H.	65* ± 10
LEKL 27		k.H.	k.H.	k.H.	k.H.	37 ± 26
LEKL 1		14 ± 6	45 ± 10	13 ± 26	13 ± 12	100* ± 0
LEKL 28		15 ± 22	k.H.	k.H.	k.H.	48 ± 33
LEKL 4		k.H.	k.H.	22 ± 9	k.H.	83* ± 15
LEKL 8		k.H.	11 ± 17	26 ± 5	k.H.	100* ± 0

Tab. 3.1: Meßwerte der Bestimmung von Leukotrien B₄ (LTB₄) und 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) für die 5-LOX-, 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) für die 12-LOX-, 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) für die 15-LOX- sowie 12-Hydroxy-5,8,10-heptatriensäure (12-HHT) für die COX-1-Aktivität;
* Signifikanz: $p < 0,05$; Konzentration der Testsubstanzen $10^{-5}M$

Für den Methylester LEKL 1, den Alkohol LEKL 4, den Butylester LEKL 8 sowie das Hydroxyethylamid des Flurbiprofen LEKL 24 wurde dagegen jeweils eine signifikante Hemmung der COX-1 zwischen 65 % und 100 % bestimmt (s. Tab. 3.1).

Das ursprüngliche NSAID Flurbiprofen zeigte im Vergleich eine ebenfalls signifikante Inhibition des Enzyms von 94 %.

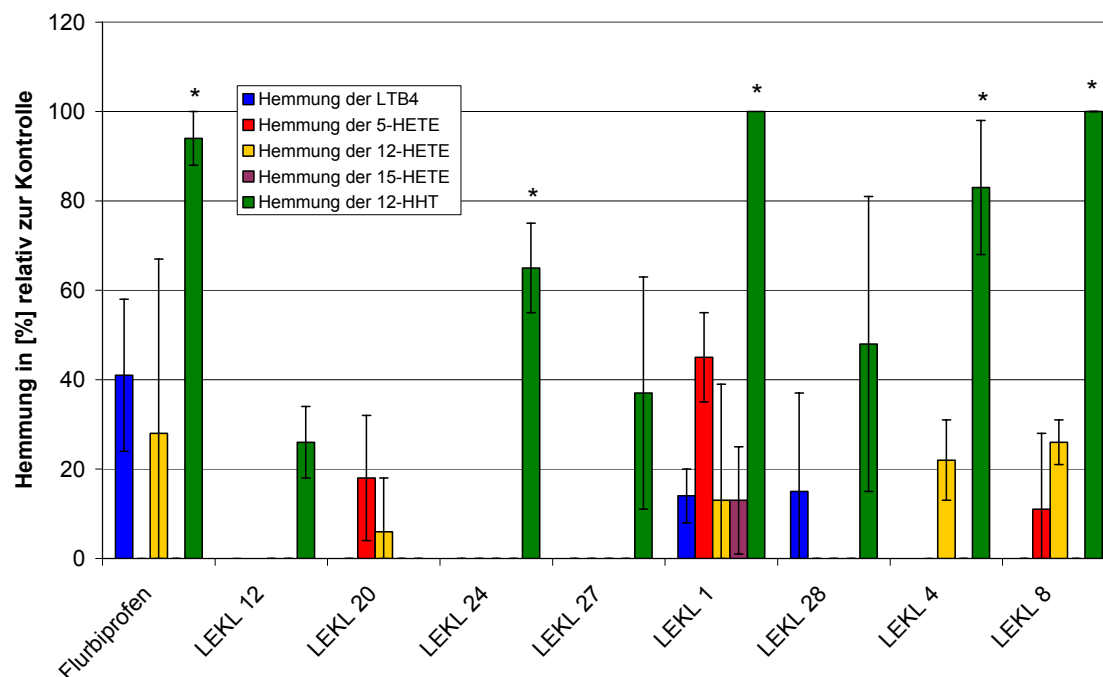
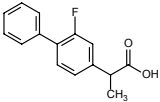
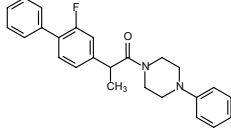
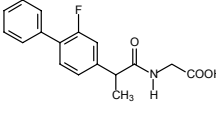
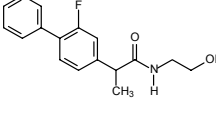
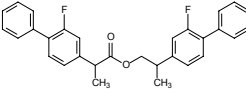
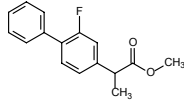
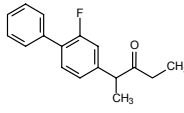
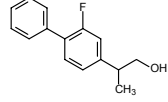
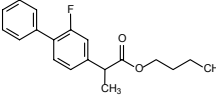


Abb. 3.6: Inhibition der Eicosanoid-Bildung (in %) im Vergleich zur Kontrolle; Bestimmung von Leukotrien B₄ (LTB₄) und 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) für die 5-LOX-, 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) für die 12-LOX-, 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) für die 15-LOX- sowie 12-Hydroxy-5,8,10-heptatriensäure (12-HHT) für die COX-1-Aktivität; * Signifikanz: $p < 0,05$; Konzentration der Testsubstanzen $10^{-5}M$

3.2.2.2 COX-2-Assay

Die Ergebnisse aus Abb. 3.7 und Tab. 3.2 zeigen, ähnlich wie auch schon im COX-1-Assay, nur bei den Verbindungen LEKL 1, LEKL 4, LEKL 8, LEKL 24 und zusätzlich bei LEKL 28 eine signifikante Hemmung der COX-2 zwischen 84 % und 96 %. Es scheint sich daher eher um eine unselektive Hemmung beider Isoenzyme der COX durch die Testsubstanzen zu handeln.

Bei allen anderen Testsubstanzen war keine bzw. nur eine geringe Inhibition des Enzyms festzustellen, weshalb diese auch an der COX-2 als nicht ausreichend wirksam eingestuft werden können.

Inhibitor	Strukturformel	Hemmung LTB ₄	Hemmung 5-HETE	Hemmung 12-HETE	Hemmung 15-HETE	Hemmung 12-HHT
Flurbiprofen (10 ⁻⁷ M)		20 ± 12	32* ± 8	23* ± 5	26* ± 9	27 ± 17
LEKL 12		5 ± 2	22 ± 1	4 ± 21	28 ± 14	22 ± 14
LEKL 20		28 ± 15	32 ± 6	8 ± 13	7 ± 29	k.H.
LEKL 24		k.H.	k.H.	k.H.	k.H.	92* ± 2
LEKL 27		37 ± 21	k.H.	k.H.	k.H.	33 ± 8
LEKL 1		38 ± 1	k.H.	k.H.	41 ± 1	96* ± 3
LEKL 28		26 ± 15	6 ± 20	k.H.	25* ± 3	84* ± 2
LEKL 4		31* ± 9	23 ± 2	8 ± 5	33* ± 2	87* ± 3
LEKL 8		47 ± 27	nicht auswert- bar	36* ± 6	50* ± 9	88* ± 0

Tab. 3.2: Meßwerte der Bestimmung von Leukotrien B₄ (LTB₄) und 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) für die 5-LOX-, 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) für die 12-LOX-, 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) für die 15-LOX- sowie 12-Hydroxy-5,8,10-heptatriensäure (12-HHT) für die COX-2-Aktivität; * Signifikanz: $p < 0,05$; Konzentration der Testsubstanzen 10⁻⁵M mit Ausnahme Flurbiprofen: 10⁻⁷M; k.H. = keine Hemmung

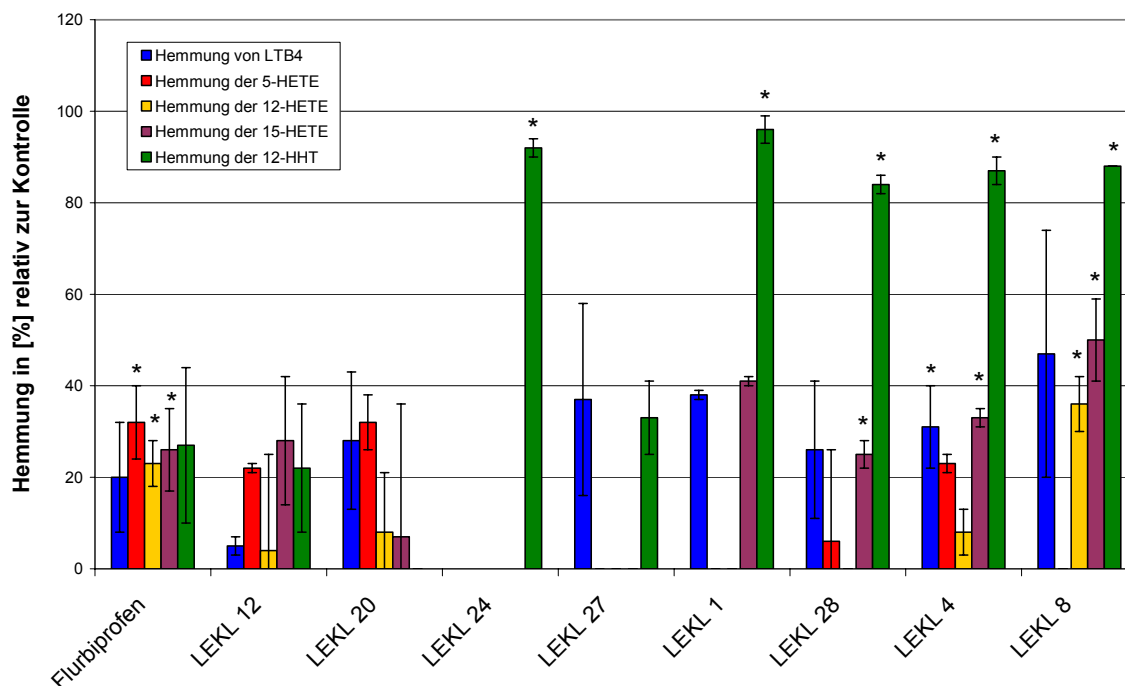


Abb. 3.7: Inhibition der Eicosanoid-Bildung (in %) im Vergleich zur Kontrolle; Bestimmung von Leukotrien B_4 (LTB_4) und 5-Hydroxyeicosatetraensäure (5-HETE) für die 5-LOX-, 12-Hydroxyeicosatetraensäure (12-HETE) für die 12-LOX-, 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) für die 15-LOX- sowie 12-Hydroxy-5,8,10-heptatriensäure (12-HHT) für die COX-2-Aktivität; * Signifikanz: $p < 0,05$, Konzentration der Testsubstanzen $10^{-5}M$ mit Ausnahme Flurbiprofen: $10^{-7}M$

3.2.2.3 Bestimmung der IC_{50} -Werte ausgewählter Substanzen an der COX-1 und COX-2

Basierend auf den Testergebnissen aus 3.2.2.1 und 3.2.2.2 wurden die Verbindungen LEKL 4, LEKL 8, LEKL 24 und LEKL 28 ausgewählt und mit einem Minimum aus 4-5 Konzentrationen der Testsubstanzen IC_{50} -Werte sowohl für die Inhibition der COX-1 als auch der COX-2 bestimmt, welche in Tab. 3.3 aufgeführt sind. Für LEKL 28 konnte der IC_{50} -Wert an der COX-1 aufgrund einer Überlagerung von Substanz und Metabolit im Chromatogramm nicht bestimmt werden. Als Vergleichssubstanzen dienten Flurbiprofen [Abouzid, 2007] und Indometacin [Frohberg, 2006], deren IC_{50} -Werte im selben Testsystem bestimmt worden waren.

Anhand der IC_{50} -Werte aus Tab. 3.3 für die COX-1 kann man erkennen, daß alle getesteten Verbindungen geringfügig schwächer wirksam sind als die Vergleichssubstanzen Flurbiprofen und Indometacin. Die Verbindungen LEKL 4, LEKL 8 und LEKL 24 zeigen an der COX-2 untereinander eine vergleichbare Hemmung. Ihre IC_{50} -Werte liegen zwischen denen der Vergleichssubstanzen. Bei Flurbiprofen läßt sich eine gewisse COX-1-Selektivität vermuten.

Substanz	IC ₅₀ (COX-1) [μM]	IC ₅₀ (COX-2) [μM]
Flurbiprofen	0,17 [0,41 ^{a.)}]	[4,23 ^{a.)}]
Indometacin	0,34 [0,21 ^{a.)}]	[0,37 ^{a.)}]
LEKL 4	0,71	1,03
LEKL 8	0,78	1,27
LEKL 24	0,67	0,97
LEKL 28	-	8,68

Tab. 3.3: IC₅₀-Werte der Verbindungen LEKL 4, LEKL 8, LEKL 24 und LEKL 28;

^{a.)} Lit. [Cryer, 1998]

3.3 Bestimmung der NMDA-antagonistischen Wirkung

Die Untersuchungen einiger ausgewählter Substanzen im NMDA-Assay wurden freundlicherweise von Kai-Uwe Schmidtke und Dr. Friedemann Gaube am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Friedrich-Schiller-Universität Jena, durchgeführt.

Glutamat ist neben Aspartat einer der wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter vom Aminosäuretyp im ZNS und als solcher bedeutsam für Lern- und Gedächtnisvorgänge, die Willkürmotorik sowie die Übertragung von afferenten Impulsen. Bei dem dazugehörigen Rezeptor handelt es sich um einen in Synapsen gelegenen, ligandengesteuerten Ionenkanal, der als NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor bezeichnet wird und an dem Glutamat als Agonisten zusammen mit Glycin als Co-Agonist binden [Johnson, 1987].

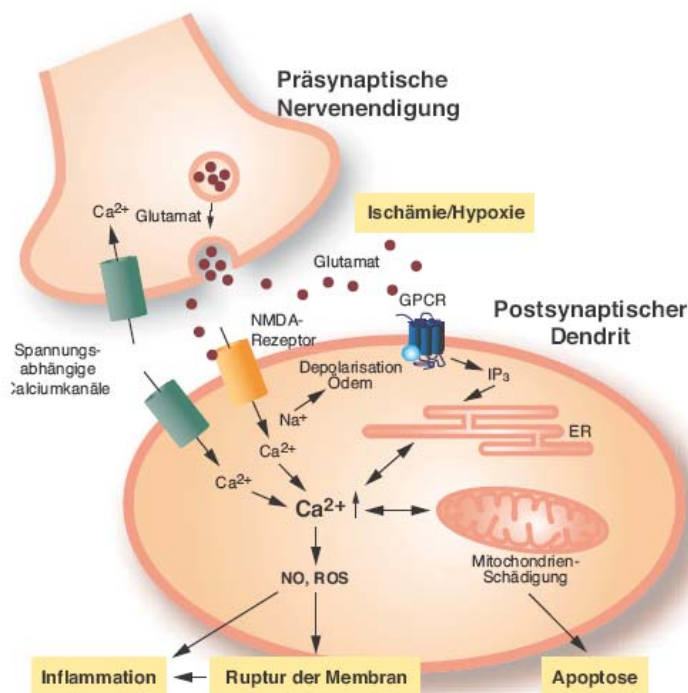


Abb. 3.8:

Pathologische Prozesse, die zu neuronalem Zelluntergang führen: intrazelluläre Calcium-Überladung als zentrales Ereignis der Zelltod-Kaskade. (ER = Endoplasmatisches Retikulum, IP₃ = Inositoltriphosphat, GPCR = G-Protein-gekoppelter Rezeptor, ROS = Reaktive Sauerstoffspezies, NO = Stickstoffmonoxid) (Abb. aus [Eckert, 2005])

Durch Überexpression des menschlichen NMDA-Rezeptors in Mausfibroblasten wird der pathologische Zustand in Neuronen bei der Alzheimer-Demenz simuliert. Dieser wird durch Zugabe von Glycin und L-Glutaminsäure induziert. Die Überstimulierung des NMDA-Rezeptors führt zu einem verstärkten Calciueinstrom in die Zellen, der wiederum eine Aktivierung verschiedener Lipasen, Proteasen, Stresskinasen und Phosphatasen auslöst, was schließlich zur Schädigung von Neuronen führt (Exzitotoxizität).

Zur Verfügung stand dabei eine stabil transfizierte Zelllinie, die die Untereinheiten NR1-1a und NR2a des humanen NMDA-Rezeptors überexprimiert.

Anhand der Verringerung der Exzitotoxizität nach Behandlung der Zellen mit den Testsubstanzen konnte die entsprechende Wirkungsweise am NMDA-Rezeptor bestimmt werden. Als Leitsubstanzen dienten Memantin und Ketamin als bekannte NMDA-Rezeptor-Antagonisten.

Die getesteten Verbindungen sind in Abb. 3.5 dargestellt.

3.3.1 Methodenbeschreibung

Für diesen Test wurde die murine Zelllinie L12-G10 verwendet, welche nach Steinmetz *et al.* [2002] durch stabile Transfektion von Zellen der Mausfibroblasten-Zelllinie L(tk-) mit den Untereinheiten NR1-1a und NR2a des humanen NMDA-Rezeptors erhalten wurde. Die Regulation der Rezeptor-Expression erfolgt durch Zugabe von Dexamethason und wird über ein *Glucocorticoid-responsive-Element* vermittelt.

Der Exzitotoxizitätstest wurde mit einigen Modifikationen analog der Methode von Steinmetz *et al.* [2002] durchgeführt.

Zur Testung von Substanzen auf antagonistische Wirkungen an den beschriebenen NMDA-Rezeptor-Untereinheiten wurden die jeweiligen DMSO-Stammlösungen vorab entsprechend mit MEM (ohne Phenolrot) zu Konzentrationen von 0,01 – 100 µM verdünnt (DMSO-Endkonzentration 0,1 %). Es wurden jeweils eine Maximum-Kontrolle (ohne Zusatz von Ketamin; 100%ige Exzitotoxizität) und eine Minimum-Kontrolle (Zusatz von 100 µM Ketamin; 0%ige Exzitotoxizität) mitgeführt.

Zur Durchführung des Assays wurden in eine 96well-Mikrotiterplatte 10.000 Zellen/well der L12-G10-Zelllinie in je 200 µl Kulturmedium (MEM-Earle mit 10 % FKS, 0,5 mM Natriumpyruvat, 1 % Penicillin-Streptomycin-Gemisch und 100 µM Ketamin) ausgesät. Aufgrund der Tatsache, daß auch ohne Zugabe des Induktors Dexamethason eine basale Expression des NMDA-Rezeptors stattfindet, ist Ketamin ein Grundbestandteil des

Mediums zum Schutz der Zellen in Kultur. Die Zellen wurden bei 37 °C und Carbogen für 30 Stunden inkubiert. Danach wurde das Medium vorsichtig abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt, das zusätzlich 4 µM Dexamethason enthielt. Nach 18-stündiger Inkubation wurden die Zellen zweimal mit MEM (ohne Phenolrot) unter Zusatz von 1 % BSA und einmal mit MEM (ohne Phenolrot) gewaschen, um das Ketamin vollständig zu entfernen. Dann erfolgte eine 30-minütige Vorinkubation mit Testsubstanzen bzw. Kontrollen (37 °C, 5 % CO₂). Anschließend wurde zur Induktion der Exzitotoxizität ein Gemisch aus Glycin und L-Glutaminsäure (10 µM) zugegeben und die Zellen nochmals für 4 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Im Anschluß erfolgte die Bestimmung der Exzitotoxizität durch kolorimetrische Bestimmung der aus den abgestorbenen Zellen freigesetzten cytoplasmatischen Lactatdehydrogenase (LDH-Assay) mit Hilfe des *Cytotoxicity Detection Kit*[®] (Roche Diagnostics, Mannheim). Gemäß der Gebrauchsanweisung des Reagenzien-Kits wurden 100 µl Zellüberstand abgenommen und mit 100 µl Reaktionslösung versetzt. Nach 35-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß erfolgte die photometrische Bestimmung des unter LDH-Katalyse gebildeten Farbstoffes Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT) (s. Abb. 3.9) im MTP-Reader (HTS 7000 Perkin Elmer) bei 492 nm (persönliche Mitteilung von K.-U. Schmidtke).

Die Integrität der Zellmembran wird als Parameter für die Exzitotoxizität verwendet. Bei einer Schädigung der Zellmembran können normalerweise nur zytosolisch vorkommende Enzyme wie die Lactatdehydrogenase (LDH) aus der Zelle ins Nährmedium austreten, welche dann im Medium nachweisbar sind. Die LDH-Aktivität kann über eine zweistufige Enzymreaktion gemessen werden, welcher die in Abb. 3.9 dargestellte Reaktion zugrunde liegt:

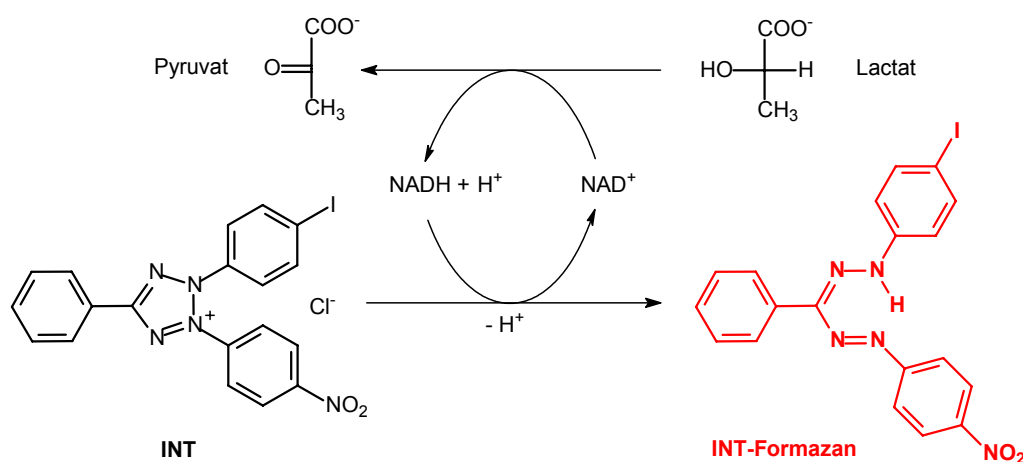


Abb. 3.9: Prinzip des Lactatdehydrogenase-Tests

In einer LDH-katalysierten Reaktion wird dabei unter Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ Lactat zu Pyruvat oxidiert. Im zweiten Schritt wird durch das Enzym Diaphorase der Wasserstoff vom NADH auf das schwachgelbe Tetrazoliumsalz INT übertragen, welches dabei zum violetten INT-Formazan reduziert wird. Das gebildete Formazan kann anschließend photometrisch bei 492 nm vermessen werden. Die LDH-Aktivität und somit die Zahl der lysierten Zellen korreliert direkt mit der innerhalb eines bestimmten Zeitraumes gebildeten Menge an Formazan.

Je Substanzkonzentration (10 und 50 μM) erfolgte zunächst mindestens eine Dreifachbestimmung. Auffällig gewordene Substanzen wurden insgesamt 7fach vermessen, sowie eine IC_{50} -Bestimmung durchgeführt.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Gleichung:

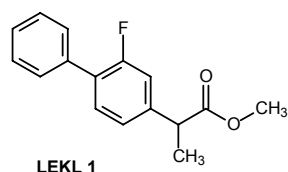
$$\text{Exzitotoxizität [\%]} = \frac{A_{\text{Probe}} - A_{\text{min}}}{A_{\text{max}} - A_{\text{min}}} \times 100$$

3.3.2 Ergebnisse und Diskussion

Eine Überexpression und Stimulation von NMDA-Rezeptoren führt zu einem massiven und schnellen Einstrom von Calcium in die Zellen, was innerhalb kurzer Zeit Schädigungen und Apoptose der Zellen verursacht. Diese Wirkung kann durch den Einsatz eines Kanalblockers wie Ketamin verhindert werden, welcher daher als Minimumkontrolle entsprechend „null“ Exzitotoxizität dient.

Die zu testenden Verbindungen wurden jeweils in einer Konzentration von 10 und 50 μM vermessen; die Ergebnisse sind in Abb. 3.10 zusammengestellt. Dabei zeigte nur der Methylester des Flurbiprofen LEKL 1 (50 μM) eine verminderte Exzitotoxizität um etwa 78%, was auf eine NMDA-antagonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor schließen läßt.

Alle anderen Verbindungen sind im verwendeten Testsystem als inaktiv einzustufen. Bei LEKL 12, LEKL 27 und LEKL 28 traten zudem Löslichkeitsprobleme auf, die dazu führten, daß übersättigte Lösungen eingesetzt werden mußten.



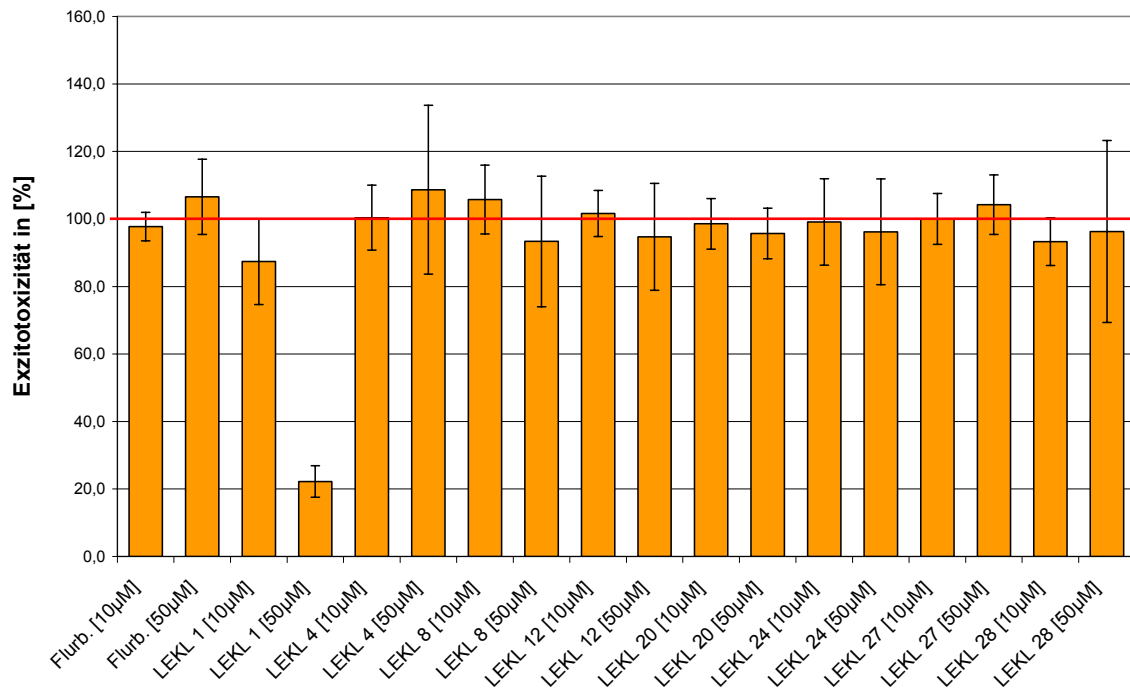
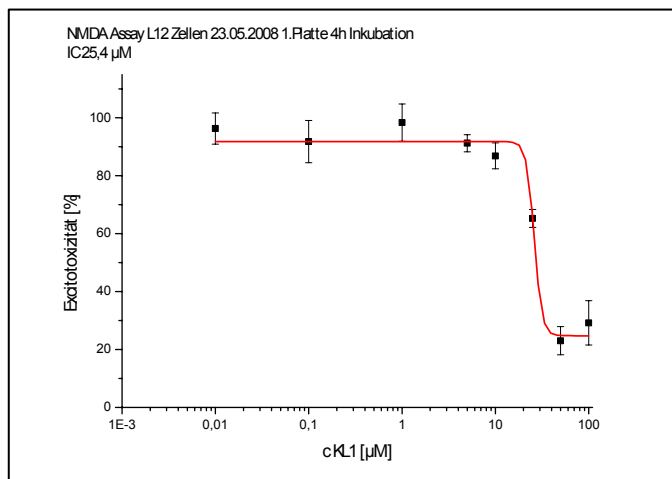


Abb. 3.10: Ergebnisse des NMDA-Assays für die getesteten Verbindungen in Konzentrationen von 10 µM bzw. 50 µM; L12-G10-Zellen, 4 h Inkubation

Aufgrund der Testergebnisse wurde im Folgenden eine IC_{50} -Bestimmung von LEKL 1 durchgeführt. Abb. 3.11 zeigt die erhaltene Konzentrations-Exzitotoxizitätskurve, mit deren Hilfe sich der IC_{50} -Wert ermitteln lässt. Zum Vergleich sind in Tab. 3.4 die im selben Testsystem bestimmten IC_{50} -Werte für die bekannten NMDA-Rezeptor-Antagonisten Ketamin und Memantin mit aufgeführt.



Substanz	IC_{50} -Wert
Ketamin	6,4 µM
Memantin	4,4 µM
KL1	25,4 µM

Tab. 3.4: IC_{50} -Werte von LEKL 1, Memantin und Ketamin im NMDA-Assay

Abb. 3.11: Bestimmung der IC_{50} von LEKL 1; Die Kurve zeigt die Exzitotoxizität in Abhängigkeit vom Logarithmus der Konzentration der Testsubstanz. Der Wendepunkt der Kurve wird als IC_{50} bezeichnet und ist definiert als die Konzentration, die die Exzitotoxizität um 50% vermindert.

Wie man anhand der Werte aus Tab. 3.4 erkennen kann, besitzt LEKL 1 eine um den Faktor 6 schwächere Wirkung am NMDA-Rezeptor als Memantin.

3.4 Neuroregenerative Eigenschaften einer Indometacin-PEDiN-Hybridverbindung *in vivo*

In Kooperation mit dem Arbeitskreis von Herr PD Dr. Redecker (Universitätsklinikum für Neurologie, Jena), insbesondere mit Frau Dr. Silke Keiner, sollten Versuche zum Einfluß bestimmter Substanzen auf die Zellproliferation und -differenzierung in der Umgebung photochemisch induzierter kortikaler Infarkte bei Ratten durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurde eine Hybridverbindung aus Indometacin und dem PETN-Metaboliten PEDiN (s. Abb. 3.12) zur Verfügung gestellt, deren Effekte auf die Versuchstiere in verschiedenen Verhaltenstests sowie histologischen Untersuchungen mit denen des PEDiN verglichen werden sollten.

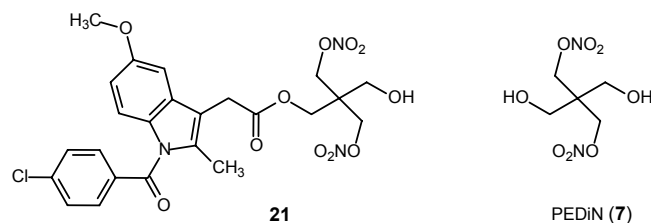


Abb. 3.12: Übersicht der getesteten Verbindungen

3.4.1 Methodenbeschreibung

Eine genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung findet sich bei Kunze *et al.* [2005], Keiner [2007] sowie Wurm *et al.* [2007]. Der Versuchsplan ist in Abb. 3.13 abgebildet.

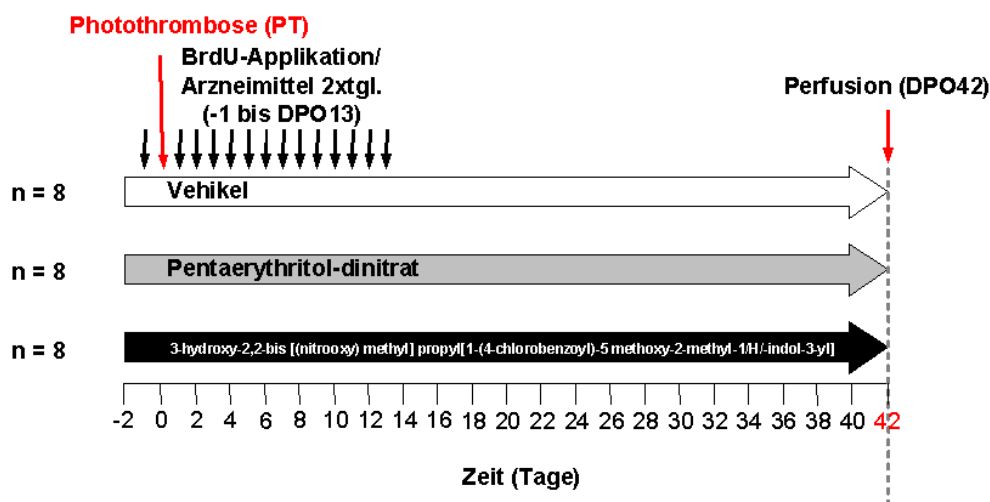


Abb. 3.13: Versuchsplan zur Bestimmung der neuroregenerativen Eigenschaften einer Indometacin-PEDiN-Hybridverbindung *in vivo*

Die Substanzapplikation (Hybridverbindung bzw. PEDiN) begann zwei Tage vor dem durch Kaltlicht-Photothrombose ausgelösten fokalen Hirninfarkt im Vorderpfotenkortex am geöffneten Schädel der narkotisierten Ratten und wurde bis zum 14. Tag nach Induktion der Thrombose fortgeführt. Zusammen mit jeder Wirkstoffgabe erhielten die Tiere intraperitoneale Injektionen von BrdU (Bromdesoxyuracil), einem Proliferationsmarker, der eine Quantifizierung von neu gebildetem Gewebe ermöglicht.

Am 42. Tag erfolgte die Tötung der Tiere sowie eine Präparation des Hirngewebes mit anschließender makroskopischer und mikroskopischer Untersuchung. Durch Bestimmung der Anzahl BrdU-positiver Zellen in der Subgranulärzone des Gyrus dentatus im Hippocampus sowie des Hirnvolumens und der Größe der photothrombotischen Läsion konnte das Ausmaß an neu gebildetem Gewebe bestimmt werden.

3.4.2 Ergebnisse und Diskussion

Die Versuche mußten leider schon nach wenigen Tagen abgebrochen werden, da die Tiere Fieber entwickelten.

3.5 Vasodilatationsversuche *in vitro*

Die Bestimmung der vasodilatatorischen Potenz der synthetisierten PETN- und GTN-Metaboliten sowie der NSAID-Organonitrat-Hybridsubstanzen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Andreas König und Frau Apothekerin Carolin Roegler am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der FSU Jena wie bei König *et al.* [2004] beschrieben, an isolierten Pulmonalarterien vom Schwein durchgeführt. Die getesteten Verbindungen PETN und GTN sowie deren Metaboliten sind in Abb. 3.14 dargestellt, die NSAID-Nitrat-Hybridverbindungen in Abb. 3.18.

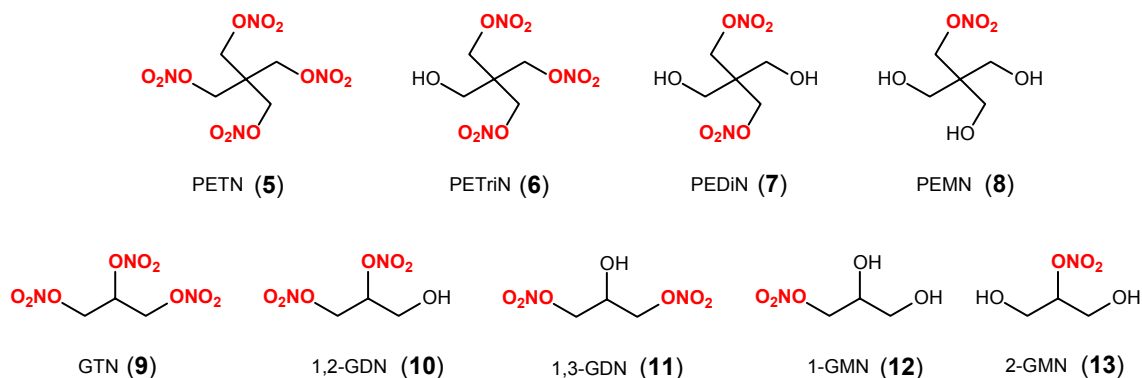


Abb. 3.14: Aktive Metaboliten des PETN und GTN

3.5.1 Methodenbeschreibung

Zur Bestimmung der vasodilatorischen Potenz wurden präparierte kleine Seitenäste der Arteria pulmonalis vom Schwein zwischen L-förmigen Metallhaken in einem Organbad fixiert, welches mit Krebs-Henseleit-Nährlösung gefüllt und bei 37°C mit Carbogen begast wurde. Die Änderung der Gefäßspannung konnte kontinuierlich über einen Kraftnehmer (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) registriert und im Anschluß daran aufgezeichnet werden. Die Geräteanordnung nach König [2008] ist in Abb. 3.15 dargestellt.

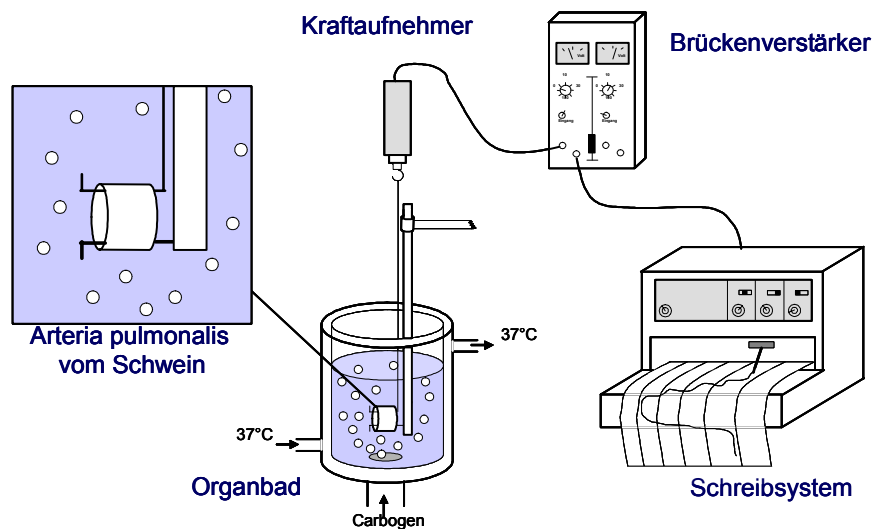


Abb. 3.15: Geräteanordnung aus König [2008]

Nach zwei- oder dreimaliger Vorkontraktion mit $\text{PGF}_{2\alpha}$ und Einstellung eines konstanten Kontraktionsplateaus wurde durch schrittweise kumulative Zugabe der jeweils zu untersuchenden Substanz eine Konzentrations-Wirkungskurve erhalten, deren Auswertung in den Abbildungen 3.16, 3.17 und 3.19 dargestellt ist. Die berechneten EC_{50} -Werte stellen Mittelwerte aus mindestens drei bis neun unabhängigen Versuchen dar. GTN wurde als Referenz mitgeführt.

3.5.2 Ergebnisse und Diskussion

3.5.2.1 Metaboliten des PETN und GTN sowie (89)

Die in den Abbildungen 3.16 und 3.17 dargestellten experimentellen Daten lassen vermuten, daß die vasodilatorische Potenz am isolierten Gefäß bei gleichem „Trägermolekül“ mit der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül korreliert. Erstaunlicherweise ist die Korrelation nicht stöchiometrisch, sondern überproportional [König, 2008].

PETN mit insgesamt vier Nitratgruppen im Molekül erwies sich unter den getesteten Verbindungen als stärkster Vasodilator, gefolgt von PETriN und GTN mit jeweils drei Nitratgruppen, welche untereinander etwa dieselbe vasodilatorische Potenz zeigten. Die Unterschiede sind nicht signifikant [König, 2007 b]. 1,2-GDN und 1,3-GDN waren im Vergleich deutlich schwächer wirksam, ebenso wie das Dinitrat PEDiN.

Die geringsten Effekte am Gefäß wurden bei den Mononitraten PEMN, 1-GMN und 2-GMN festgestellt.

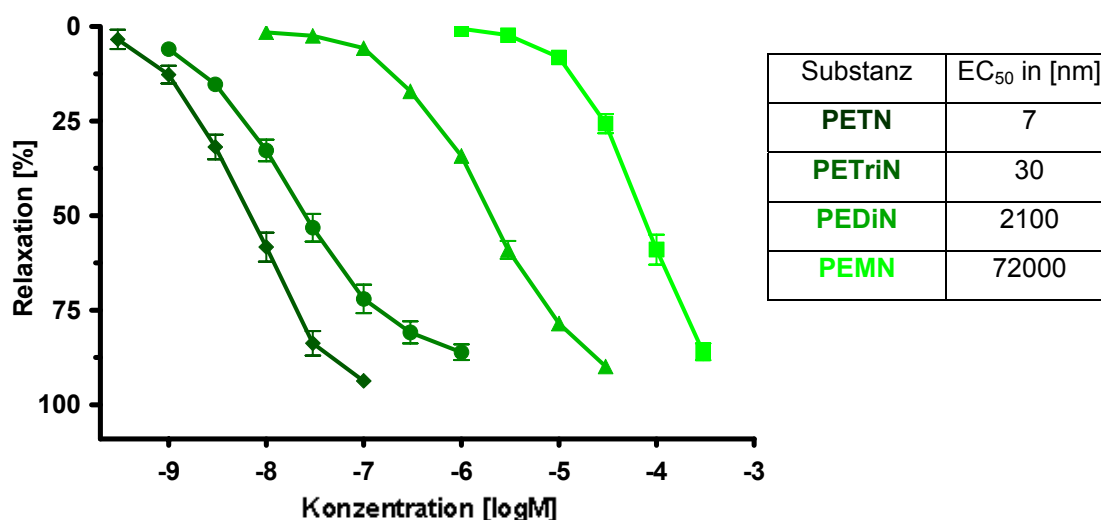
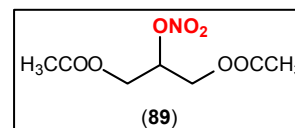


Abb. 3.16: Konzentrations-Wirkungskurven von PETN, PETriN, PEDiN und PEMN

Im Vergleich zeigte sich, daß 2-GMN etwa 100mal schwächer wirksam war als die Verbindung **89**. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß die Anzahl der Nitratgruppen im Molekül nicht der



einzig ausschlaggebende Parameter für die vasodilatorische Potenz darstellt, sondern auch das organische Grundgerüst der jeweiligen Substanz eine Rolle spielt. Weißler *et al.* [2003] bestätigten dies anhand einer Reihe von Benzylnitraten, bei welchen lediglich die Substitution am aromatischen Ring variiert, das Grundgerüst mit der Nitratgruppe jedoch beibehalten wurde, ebenso wie König *et al.* [2007 a], welcher Untersuchungen an einer Reihe von Mononitraten mit verschiedenen Grundgerüsten durchführte. Er spekulierte, daß eine höhere Lipophilie möglicherweise die Bioaktivierung des gebundenen Nitrates unterstützen könnte [König, 2007 a].

Die isomeren Verbindungen 1,3-GDN und 1,2-GDN bzw. 1-GMN und 2-GMN zeigen untereinander ebenfalls große Unterschiede der EC₅₀-Werte, wobei sich die Verbindungen mit der Nitratgruppe in Position „C1“ jeweils um den Faktor 3,7 bzw. 2 als stärker bioaktiv erwiesen. Dies könnte mit der höheren Stabilität der Nitratgruppe in Position „1“ im Vergleich zu „2“ zusammenhängen, was schon Capellos *et al.* [1982, 1984]

in Untersuchungen zur basischen Hydrolyse der vier Substanzen vermuteten (s. Kap. 2.2.9). Weiterhin ist eine unterschiedliche Aktivität und Reaktivität hinsichtlich des bioaktivierenden Enzyms möglich [Lange, 2008].

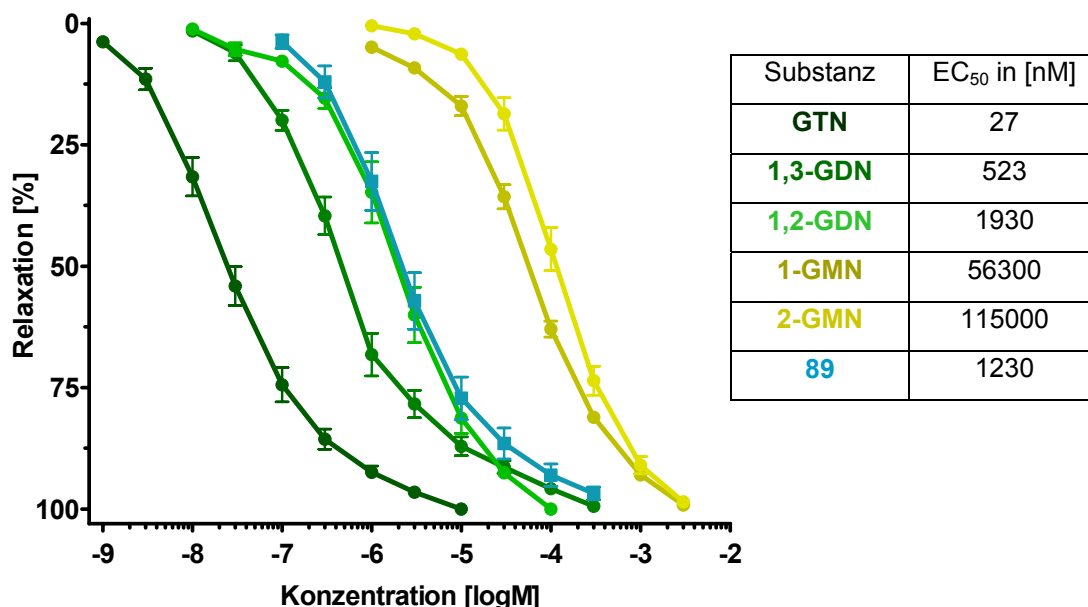


Abb. 3.17: Konzentrations-Wirkungskurven von GTN, 1,2- und 1,3-GDN, 1- und 2-GMN sowie 2-GMN-1,3-diacetat (89)

3.5.2.2 NSAID-Nitrat-Hybridsubstanzen

Die synthetisierten Metaboliten des PETN dienten als Ausgangsstoffe für die Synthese von NSAID-Nitrat-Hybridverbindungen, in welchen das Verhältnis von NSAID-Molekül zur Zahl der Nitratgruppen zwischen 1 : 3 und 3 : 1 variiert wurde (s. Abb. 3.18).

Die Hybridverbindungen aus Flurbiprofen bzw. Indometacin mit entweder PETriN, PEDiN oder PEMN wurden im Organbad auf ihre vasodilatorische Potenz untersucht. Die jeweiligen EC₅₀-Werte und die Konzentrations-Wirkungskurven der Substanzen im Vergleich mit PETriN und PEDiN sind in Abb. 3.19 dargestellt.

Die Verbindung **14** stellt ein Hybrid aus Flurbiprofen und PETriN dar, zeigte jedoch im Vergleich zum PETriN eine um den Faktor 130 mal schwächere Vasodilatation und war damit sogar noch weniger wirksam als PEDiN.

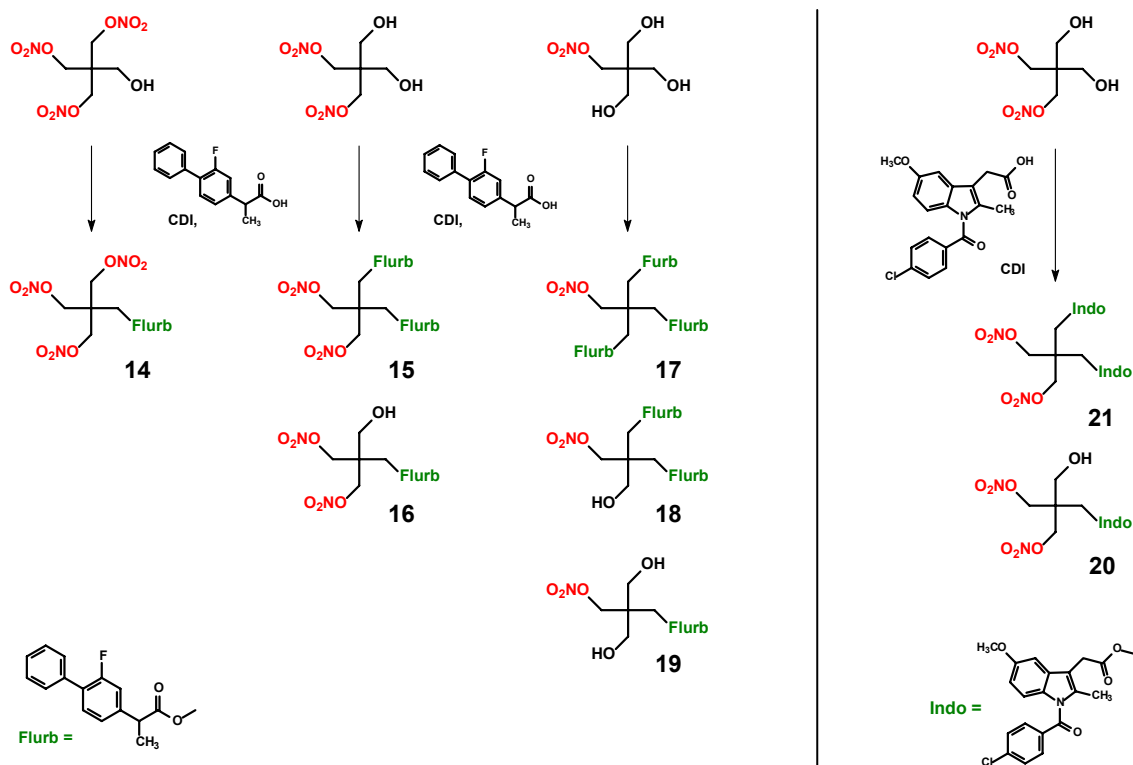


Abb. 3.18: NSAID-Organonitrat-Hybridverbindungen aus Flurbiprofen und PETriN, PEDiN oder PEMN (linke Seite) bzw. Indometacin und PEDiN (rechte Seite)

Beim Vergleich der Dinitrate konnte festgestellt werden, daß die Unterschiede in den EC₅₀-Werten von PEDiN und den Hybriden mit zwei Nitratgruppen nicht so stark ausgeprägt waren wie beim Trinitrat, allerdings war auch hier das PEDiN die Verbindung mit dem stärker vasodilatierenden Effekt.

Von den vier verschiedenen Substanzen lieferten allerdings nur **16** und **20** befriedigende sigmoidale Konzentrations-Wirkungskurven, Verbindung **15** zeigte einen mehr linearen Kurvenverlauf, welcher nach König [2008] auf unspezifische Effekte am Gefäß zurückzuführen sein könnte. Leider konnten die Verbindungen **17** bis **19** sowie **21** aufgrund von Löslichkeitsproblemen in der Nährlösung nicht vermessen werden. Von einer vermehrten Zugabe an DMSO zur Verbesserung der Löslichkeit mußte infolge eines Eigeneffektes am Gefäß abgesehen werden, der im Falle der Mononitrate sogar die vasodilatorische Potenz der Substanzen überstieg.

Vergleicht man die EC₅₀-Werte der beiden Dinitrate **15** und **16** ist eine deutliche Wirkungsabschwächung bei **15** durch den zusätzlichen sterisch anspruchsvollen Flurbiprofenrest festzustellen, welcher nach König [2008] zu einer Abnahme bzw. zum Verlust der Affinität zum bioaktivierenden Enzym ALDH-2 führen könnte. Zudem zeigte sich eine Löslichkeitsverschlechterung der Substanzen mit zunehmendem Substitutions-

grad und abnehmender Zahl an freien Hydroxylgruppen. Dies könnte der Grund dafür sein, daß Verbindung **14** trotz einer weiteren Nitratgruppe geringfügig schwächer wirksam war als **16**, da eine Präzipitation der Substanz während der Zugabe zur Nährlösung nicht ausgeschlossen werden kann. Der Austausch des Flurbiprofenrestes gegen einen sterisch noch anspruchsvolleren Indometacinrest, wie bei den Verbindungen **16** und **20** verwirklicht, rief einen um mehr als 3-fach schwächeren vasorelaxierenden Effekt hervor, wobei auch hier die sterische Hinderung eine Rolle zu spielen scheint, da die Zahl der Nitrat- und freien Hydroxylgruppen sowie der Substitutionsgrad der Verbindungen identisch sind.

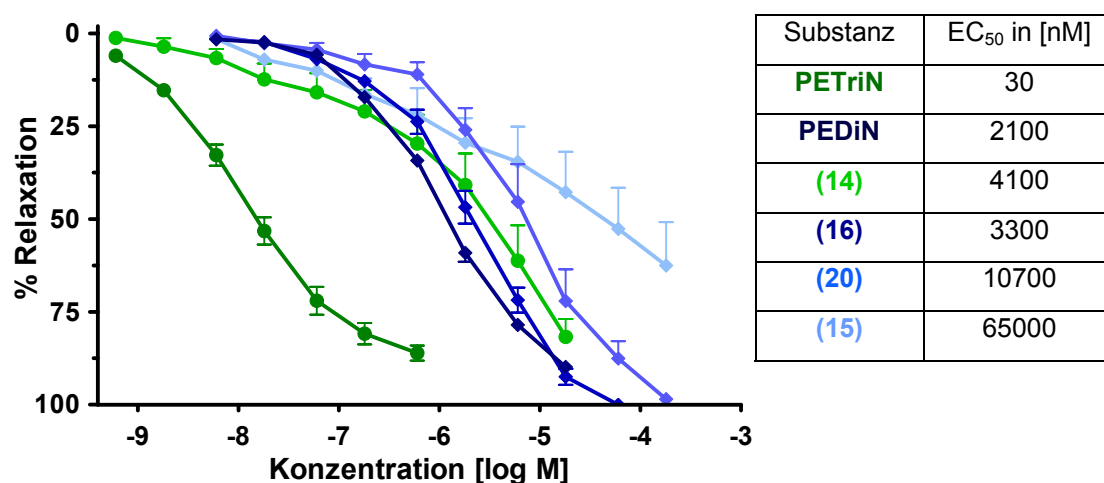


Abb. 3.19: Konzentrations-Wirkungskurven und EC₅₀-Werte der NSAID-Nitrat-Hybride **14** mit 3 Nitratgruppen sowie **15**, **16** und **20** mit 2 Nitratgruppen im Vergleich zu PETriN und PEDiN

Um vasodilatierende Effekte durch Flurbiprofen auszuschließen, wurde dieses ebenfalls im Organbad vermessen. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Verbindung einem der DMSO-Kontrolllösung entsprechenden Eigenrelaxationseffekt zeigte, der vernachlässigt werden konnte.

Die durchgeführten Organbadversuche bestätigen die unter 3.5.2.1 getroffenen Vermutungen, daß neben der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül auch der organische Rest der Verbindungen und der Substitutionsgrad eine wichtige Rolle spielen – anhand der Hybridverbindungen wird dies durch sterische Effekte wie den Flurbiprofen- bzw. Indometacinrest sowie durch die Anzahl der freien Hydroxylgruppen im Molekül deutlich, da sich mit steigender Zahl die Löslichkeit im wässrigen Medium und damit die „Testfähigkeit“ der Verbindungen verbessert.

4. Zusammenfassung

Der Gliederung in Kap. 1.5 folgend, sollen die wesentlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammengefaßt werden.

Chemische Aspekte

1.) *Synthese von Flurbiprofen-Derivaten mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen:*

Im Sinne einer strukturellen Abwandlung wurden 14 Derivate des S-Flurbiprofens synthetisiert (s. Abb. 4.1). Dazu gehören Ester mit Alkoholen verschiedener Kettenlänge (**23-31**), verschiedene Amide (**37-44**), ein dem Flurbiprofen verwandtes Keton (**3**) sowie, durch Reduktion der Carboxylgruppe mit Lithiumaluminiumhydrid, der entsprechende Alkohol **4** und dessen Ester mit Flurbiprofen (**32**). Schließlich wurde die esterartige „Einbettung“ des Flurbiprofens in zwei hochlipophile Triglyceride realisiert (**35, 36**).

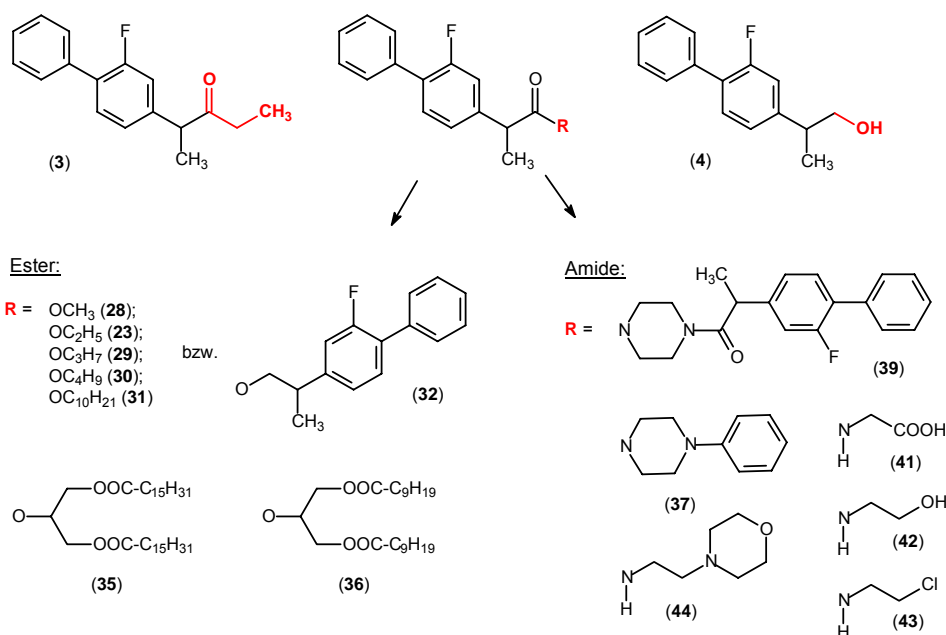


Abb. 4.1: Synthetisierte Flurbiprofen-Derivate mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen

2a.) *Synthese der Metaboliten des PETN und GTN:*

Es wurden alle in Abb. 4.2 dargestellten Nitrat-haltigen Metaboliten des PETN und GTN aufbauend aus Halogenverbindungen mit Silbernitrat oder abbauend durch schrittweise Reduktion eines höheren Nitrats mit Hydrazinhydrat synthetisiert.

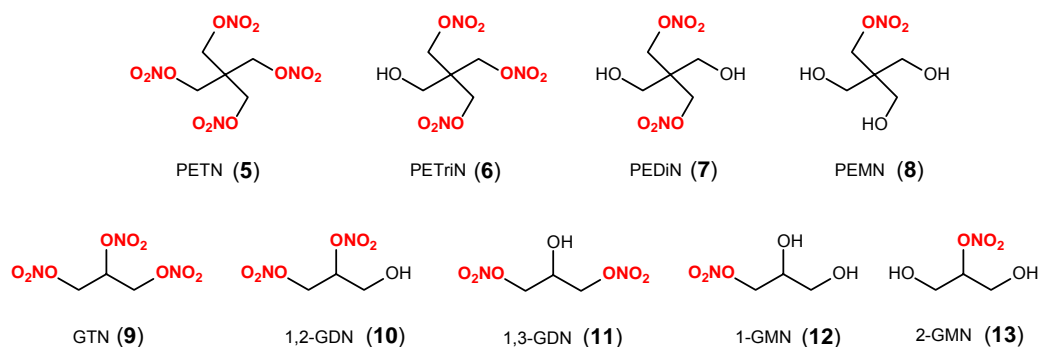


Abb. 4.2: PETN und GTN sowie deren bioaktive Metaboliten

Die PETN-Metaboliten PETriN und PEDiN konnten durch den reduktiven Abbau des PETN mit unterschiedlichen molaren Verhältnissen Hydrazinhydrat erhalten werden (s. Abb. 4.3). Zur Reaktionskontrolle wurde eine HPLC-Methode entwickelt, die eine basisliniengetrennte Bestimmung von PETN, PETriN und PEDiN ermöglichte.

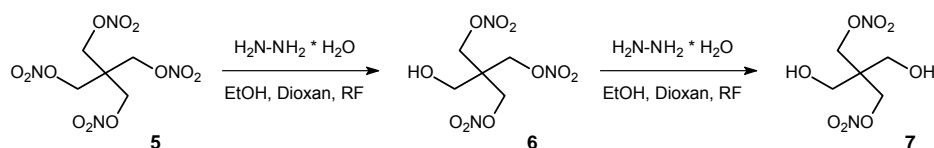


Abb. 4.3: Reduktion von PETN zu PETriN und PEDiN mit Hydrazinhydrat

Für die Metaboliten PEMN, 1,2- und 1,3-GDN, 1-GMN und ebenfalls PEDiN erwies sich eine nucleophile Substitution der entsprechenden Alkylhalogenide mit Silbernitrat als erfolgreich (s. Abb. 4.4). Die Methode wurde für die jeweilige Verbindung bezüglich Reaktionsbedingungen (Konzentration der eingesetzten Edukte, Temperatur, Lösungsmittel) und Aufarbeitung optimiert. Zur Reaktionskontrolle für die Synthese von 1,2- und 1,3-GDN wurde die für PETriN und PEDiN entwickelte HPLC-Methode an die veränderten chromatographischen Eigenschaften der Verbindungen angepaßt.

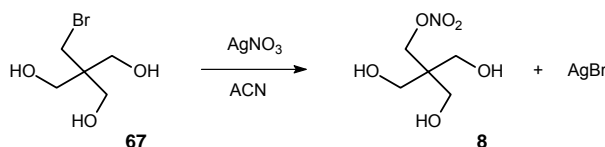


Abb. 4.4: Synthese von Alkylnitrat durch Umsetzung von Alkylhalogeniden mit Silbernitrat am Beispiel des PEMN (8)

Die Verbindung 2-GMN konnte zunächst auf keinem der beiden oben beschriebenen Wege erhalten werden, so daß nach alternativen Synthesemöglichkeiten gesucht wurde. Zum gewünschten Produkt führte schließlich die Darstellung ausgehend von

1,3-Dihydroxyaceton über eine 4-Stufen-Synthese. Durch Isomerisierung während des letzten Schritts der Synthese konnte die Substanz allerdings nur im Gemisch mit 1-GMN erhalten werden. Der Mechanismus der Isomerisierung wurde von Capellos *et al.* [1982] wie folgt spekuliert:

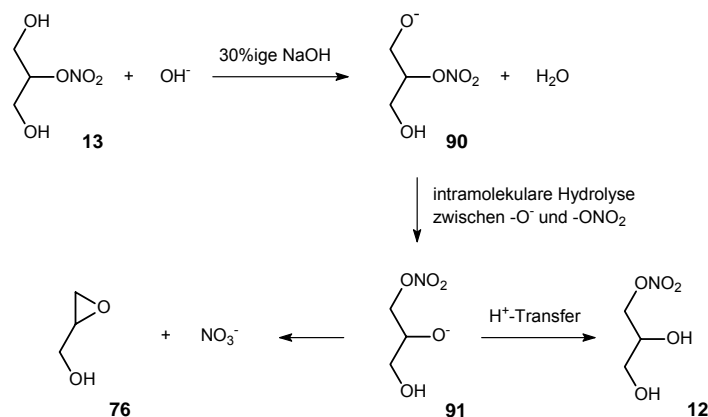


Abb. 4.5: Isomerisierung von 2-GMN zu 1-GMN und weitere Hydrolyse zu Glycidol und Nitrat

Eine Abtrennung der Verunreinigung gelang aufgrund des fast identischen chromatographischen Verhaltens und der ähnlichen physikochemischen Eigenschaften bisher nicht.

2b.) Synthese von Hybridsubstanzen aus den PETN-Metaboliten und Flurbiprofen:

Die Darstellung von Flurbiprofen-Organonitrat-Hybridsubstanzen aus dem Bromanalogon des PEDiN und S-Flurbiprofen gelang aufgrund der geringen Reaktionsfähigkeit der im ersten Syntheseschritt erhaltenen Bromester-Verbindung mit Silbernitrat nicht, so daß dieser Syntheseweg verworfen werden mußte.

Eine Darstellung aller in Abb. 4.6 gezeigten Hybridverbindungen resultierte nach Anpassung der Synthesebedingungen aus der Umsetzung der PETN-Metaboliten entweder mit dem Säurechlorid des Flurbiprofens in Pyridin oder CDI-aktiviertem Flurbiprofen.

Dabei stellte sich heraus, daß Synthesen über eine Aktivierung der Carbonsäurefunktion des Flurbiprofen mit CDI in trockenem Acetonitril mit höheren Ausbeuten verbunden waren als bei Verwendung von THF.

Neben den in Abb. 4.6 dargestellten Substanzen wurden drei weitere Hybridverbindungen aus den Amiden 41, 42 und dem Alkohol 4 mit entweder PETriN (7) oder Nitratopivalinsäure hergestellt (111, 113, 114).

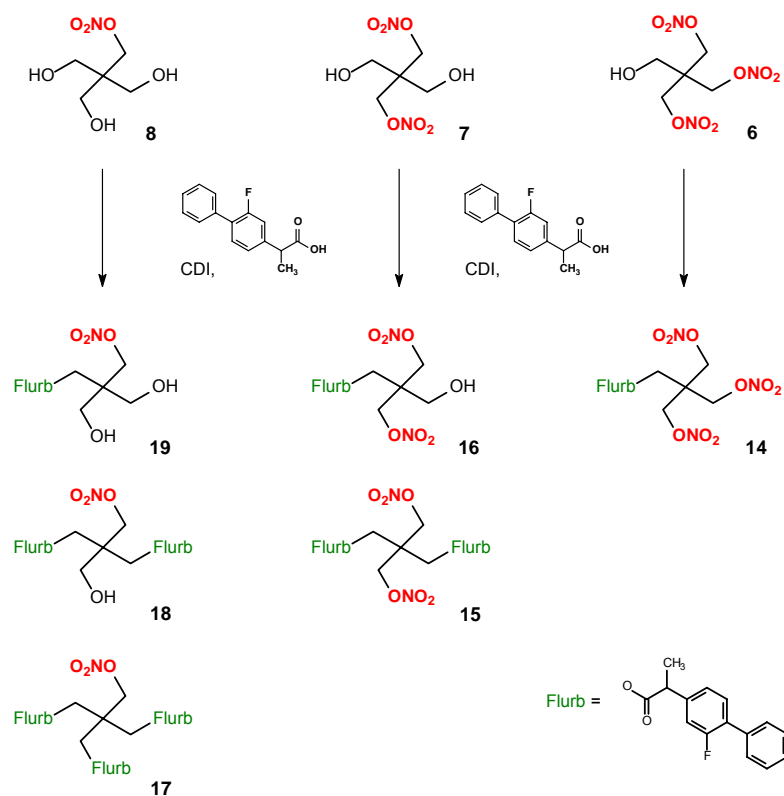


Abb. 4.6: Synthese der NSAID-Nitrat-Hybridsubstanzen aus S-Flurbiprofen und den Metaboliten des PETN

2c.) Synthese von Hybridsubstanzen aus PEDiN und R-Flurbiprofen bzw. Indometacin:

Analog den Zielsubstanzen aus 2b.) konnten Hybridverbindungen aus PEDiN und R-Flurbiprofen bzw. Indometacin, jeweils im Verhältnis 1:1, erhalten werden (**22** bzw. **20**). Zusätzlich wurde bei der Synthese der Indometacin-PEDiN-Hybridverbindung (1:1) auch der Diester (**21**) aus zwei Molekülen Indometacin und einem Molekül PEDiN isoliert werden (s. Abb. 4.8).

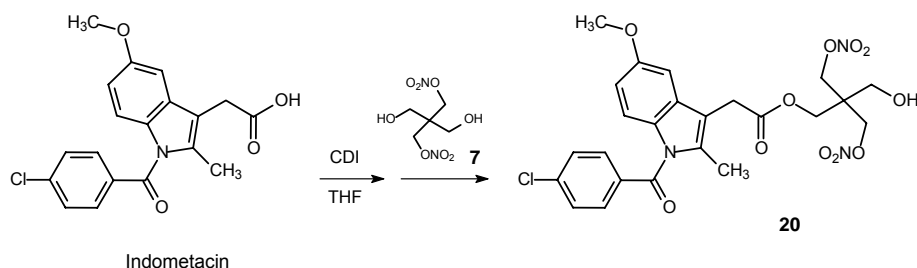


Abb. 4.7: Synthese von **20** durch Veresterung von Indometacin mit PEDiN

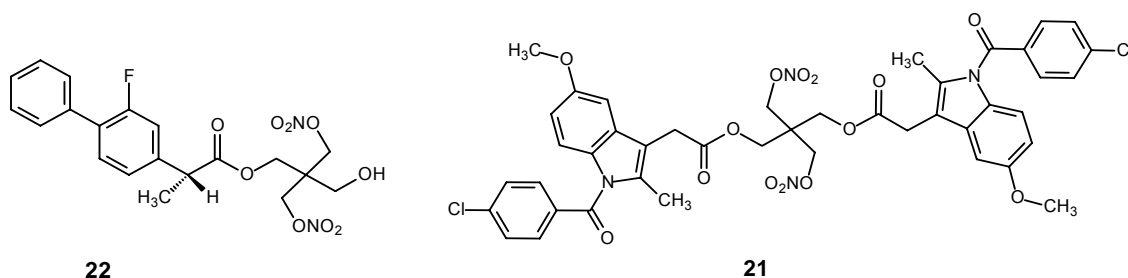


Abb. 4.8: Hybridverbindungen aus R-Flurbiprofen bzw. Indometacin und PEDiN

Pharmakologische Aspekte

3.) Testung auf A β -senkende Wirkung:

Die durchgeführten Untersuchungen ließen für die meisten der getesteten Verbindungen keine Verminderung der A β_{42} -Bildung erkennen; bei einigen Substanzen wurde sogar eine selektive Erhöhung festgestellt. Das Phenylpiperazinamid **37**, das Hydroxyethylamid **42** sowie das Morpholinderivat **44** zeigten zunächst günstige Effekte auf die Amyloidbildung mit einer, allerdings nicht A β_{42} -selektiven, 60 - 70%igen A β -Reduktion im Vergleich zur Kontrolle. Die Durchführung einer zweiten Testreihe mit dem Hydroxyethylamid und dem Morpholinderivat ließ allerdings auf zytotoxische Effekte schließen, so daß keine sicheren Aussagen über die Gründe der Reduktion der A β_{42} -Bildung und die allgemeine Verträglichkeit getroffen werden können.

Alle getesteten Verbindungen sind daher unter den gegebenen Testbedingungen als nicht günstig zur Inhibition der γ -Sekretase und damit der A β_{42} -Bildung einzustufen. Toxizität und Löslichkeitsprobleme (infolge des lipophilen Biphenyls) der Flurbiprofenderivate können mögliche Ursachen sein. Zudem scheint nach Schmidt *et al.* [2006] und Peretto *et al.* [2005] eine freie Carboxylgruppe für die Wirkung notwendig zu sein, was bei den meisten der getesteten Verbindungen nicht mehr der Fall war. Die Substanzen waren jedoch schon vor der Veröffentlichung dieser Postulate synthetisiert worden.

4.) Bestimmung der COX-1- und COX-2-Inhibition:

Die durchgeführten Untersuchungen zeigten für das Hydroxyethylamid- (**42**), den Methyl- (**28**) und Butylester (**30**) des Flurbiprofens sowie den durch Reduktion der Säuregruppe aus Flurbiprofen erhaltenen Alkohol (**4**) eine signifikante, unselektive Hemmung sowohl der COX-1 als auch der COX-2.

An den IC_{50} -Werten für die COX-1-Inhibition wird deutlich, daß alle getesteten Verbindungen (**4**, **30**, **42**) geringfügig schwächer wirksam sind ($IC_{50} = 0,67 - 0,78 \mu M$) als die Vergleichssubstanzen Flurbiprofen und Indometacin ($IC_{50} = 0,17$ bzw. $0,34 \mu M$). Im Bezug auf die Hemmung der COX-2 liegen die IC_{50} -Werte der Testsubstanzen ($IC_{50} = 0,97 - 1,27 \mu M$) zwischen den von Cryer *et al.* [1998] für Indometacin und Flurbiprofen bestimmten IC_{50} -Werten ($0,37$ bzw. $4,23 \mu M$).

5.) *Bestimmung der NMDA-antagonistischen Wirkung:*

Mit Ausnahme des Methylesters von Flurbiprofen (**28**) ließ sich bei keiner der getesteten Verbindungen eine signifikante NMDA-antagonistische Wirkung in dem verwendeten Zellassay nachweisen. Der nach Pozzoli *et al.* [1996] synthetisierte Ester zeigte im Vergleich mit Memantin ($IC_{50} = 4,4 \mu M$) eine etwas schwächere Wirkung am NMDA-Rezeptor ($IC_{50} = 25,4 \mu M$).

6.) *In vivo Untersuchung der neuroregenerativen Eigenschaften einer Indometacin-PEDiN-Hybridverbindung nach experimentell induzierten Hirninfarkten bei Ratten:*

Die Versuche mußten leider schon nach wenigen Tagen abgebrochen werden, da die Tiere Fieber entwickelten.

7.) *Bestimmung der vasodilatorischen Potenz der Metaboliten von PETN und GTN sowie der Hybridsubstanzen aus 2b.) und 2c.):*

Die vasodilatorische Potenz der Metaboliten am isolierten Gefäß steigt bei gleichem organischen Grundgerüst mit steigender Anzahl der Nitratgruppen, was anhand der EC_{50} -Werte innerhalb der PETN-Reihe in der Abfolge PEMN, PEDiN, PETriN und PETN deutlich wird [König, 2008]. Neben der Anzahl der Nitratgruppen spielt aber auch das organische Trägermolekül für die Gefäßwirkung eine wichtige Rolle. Dies wird anhand der unterschiedlichen EC_{50} -Werte in den Reihen der Dinitrate bzw. Mononitrate von Glycerol einschließlich des zweifach acetylierten 2-GMN deutlich. Erhöhte Lipophilie und/oder Hydrolysestabilität der Verbindungen resultierten unter den gegebenen Versuchsbedingungen in einer stärkeren Wirkung am isolierten Gefäß.

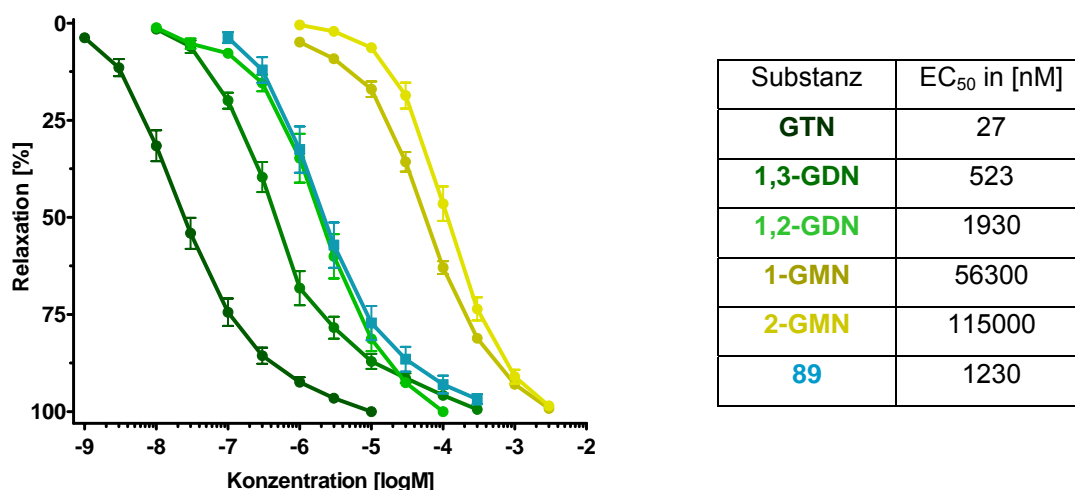


Abb. 4.9: Konzentrations-Wirkungskurven und EC₅₀-Werte von GTN, 1,2- und 1,3-GDN, 1- und 2-GMN sowie 2-GMN-1,3-diacetat (**89**)

Die aus den PETN-Metaboliten PETriN, PEDiN und PEMN mit Flurbiprofen bzw. Indometacin in unterschiedlichen Verhältnissen dargestellten Hybridmoleküle zeigten stets eine geringere vasodilatorische Potenz als die Ausgangsnitrate. Sterische Effekte bedingt durch große Reste des Flurbiprofens oder Indometacins am Nitratträgermolekül, bestätigen auch hier einen deutlichen Einfluß des Grundgerüsts auf die Gefäßwirkung. Denkbar ist eine behinderte Affinität und Reaktivität am bioaktivierenden Enzym. Zudem zeigte sich eine Löslichkeitsverschlechterung der Substanzen mit zunehmendem Substitutionsgrad und abnehmender Zahl an freien Hydroxylgruppen, was dazu führte, daß nicht für alle Verbindungen Konzentrations-Wirkungskurven ermittelt werden konnten.

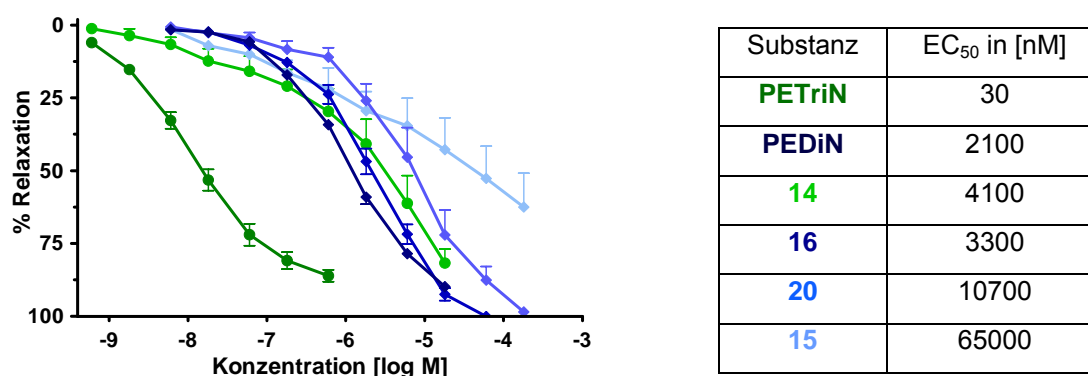


Abb. 4.10: Konzentrations-Wirkungskurven und EC₅₀-Werte der NSAID-Nitrat-Hybride **14** mit 3 Nitratgruppen sowie **15**, **16** und **20** mit 2 Nitratgruppen im Vergleich zu PETriN und PEDiN

Die durchgeführten Organbadversuche bestätigen die Vermutungen, daß neben der Anzahl der Nitratgruppen im Molekül auch der organische Rest der Verbindungen sowie der Substitutionsgrad eine wichtige Rolle spielen.

5. Experimenteller Teil

5.1 Geräte, Materialien und Methoden

5.1.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Verlaufskontrollen der Synthesen wurden, soweit möglich, dünnschichtchromatographisch durchgeführt. Die eingesetzten DC-Platten der Firma Merck (Darmstadt) waren mit Kieselgel 60 beschichtet, welche Fluoreszenzindikator F_{254} enthielten. Eine Destillation der verwendeten Fließmittel war nicht erforderlich.

Die Detektion der entwickelten DC-Platten erfolgte visuell unter Ausnutzung der substanzbedingten Fluoreszenzlöschung im UV-Licht bei 254 nm (UV-Lampe: DESAGA MinUVIS, Typ 131200, 30 W, Heidelberg) und/oder der Farbentwicklung nach Einsatz spezifischer Sprühreagenzien. Aufgrund der häufig fehlenden Fluoreszenzlöschung waren Sprühreagenzien besonders für die Detektion der organischen Nitrate unverzichtbar. Dazu wurden verwendet:

1. 0,5% Diphenylamin in konz. Schwefelsäure
2. Kaliumiodid-Stärke-Lösung (nach Ph. Eur. 5.0)

Blauviolettffärbungen nach dem Besprühen weisen auf des Vorhandensein oben genannter Verbindungen hin.

5.1.2 Säulenchromatographie (SC)

Die säulenchromatographischen Trennungen wurden mit Kieselgel 60 (63 – 200 μm) der Firma Merck (Darmstadt) und einer Säulenbeladung von 1-2% vorgenommen. Die Fließmittelkomponenten wurden vor Gebrauch destilliert.

Die Chromatographie wurde ohne Anlegen eines äußeren Drucks durchgeführt.

5.1.3 Gaschromatographie, gekoppelt mit Massenspektrometer (GC/MS)

Die GC/MS-Messungen wurden an einem G 1800C, GCD-Plus-System der Firma Hewlett Packard (USA) mit einem EI-Massenspektrometer durchgeführt. Die Messungen erfolgten unter Verwendung von Helium als Trägergas (0,9 bar) und einer HP-5ms-Kapillarsäule (Länge 30m, 0,25 mm ID, Film 0,25 μm , J & W Scientific) mit folgenden Einstellungen: Injektor 250°C, Detektor 280°C. Je nach untersuchter Substanz wurden zwei verschiedene Temperaturprogramme verwendet:

- A. Wenn nicht anders vermerkt: Temperaturprogramm mit 100°C für 3 min, anschließend heizen auf 280°C mit einer Heizrate von 10°C/min, Endtemperatur halten für 19 min, Gesamtlaufzeit 40 min
- B. Temperaturprogramm mit 100°C für 3 min, anschließend heizen auf 180°C mit einer Heizrate von 5°C/min, Temperatur halten für 1 min, anschließend wieder heizen auf 280°C, Heizrate 20°C/min, Endtemperatur halten für 1 min, Gesamtlaufzeit 26 min

5.1.4 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC mit UV-Detektion diente zur Identifizierung und Reinheitsprüfung sowie zur Kontrolle des Stoffumsatzes bei den Synthesen der PETN-Metabolite PETriN und PEDiN, sowie von 1,2- und 1,3-GDN. Hinsichtlich PEMN, 1- und 3-GMN wurde keine Methodenoptimierung durchgeführt, da eine Umsatzkontrolle auch auf anderem Wege erfolgen konnte.

Für alle durchgeführten Versuche wurde folgende Gerätekonfiguration verwendet:

Injektor:	Autoinjektor SIL-10A mit Probenwechsler; Injektionsvolumen stufenlos	
Pumpen:	LC-10AS (isokratisch)	
Detektor:	SPD-M10A Diodenarray-UV-Detektor (190-400 nm, 1 nm-Einteilung)	
Steuermodul:	CBM-10A, verbunden mit <i>Class-LC10</i> -Workstation	
	Integrationsparameter	
	Width: 5	Minimal Area: 1000
	Drift: 5	Stop Time: variabel
	Slope: auto (i.d.R. < 1000)	
	(alle Komponenten von Shimadzu Europa GmbH / 47269 Duisburg)	
Stationäre Phase:	Chromolith® Performance RP-18-Säule (5 µm) 100-4,6 (Merck, Darmstadt)	
Mobile Phase:	<i>Methode A:</i> Methanol / Wasser (50 / 50 [V/V]) <i>Methode B:</i> Methanol / Wasser (30 / 70 [V/V])	
Flußrate:	0,3 ml / min	
Gradient:	isokratisch	
Detektion:	UV 215 nm	

Zur Herstellung der Fließmittelgemische wurde entionisiertes Wasser sowie Methanol der Spezifikation „HPLC Gradient Grade“ von VWR (Darmstadt) verwendet. Die Entgasung der Fließmittel erfolgte durch Heliumbegasung über 10 Minuten.

Methode A:

Diese Methode wurde für die Trennung von PETN, PETriN und PEDiN nach Umsetzung des PETN mit Hydrazinhydrat (s. Kap. 2.2.3 und 2.2.4) entwickelt und fand ebenso Anwendung in der Trennung von PEDiN und seinem Edukt 2,2-Bis(brommethyl)-1,3-propandiol (**61**) (s. Kap. 2.2.4).

Die Verbindungen PETN, PETriN und PEDiN konnten, wie in Abb. 2.70 dargestellt, jeweils basisliniengetrennt voneinander detektiert werden. Eine Methodenoptimierung hinsichtlich Peaksymmetrie war in keinem der Fälle erforderlich, da nur qualitative Aussagen zur Umsatzkontrolle getroffen werden sollten. Eine Übersicht aller ermittelten Retentionszeiten findet sich in Tab. 4.1.

Substanz	Retentionszeit in [min]
PETN	22,3
PETriN	13,5
PEDiN	7,6
PEMN	5,8
61	8,8

Tab. 4.1: Retentionszeiten von PETN, PETriN, PEDiN, PEMN und **61** unter den Bedingungen der Methode A

Im Unterschied zur Synthese des PEDiN aus PETN mit Hydrazinhydrat (s.o.) konnte die Darstellung des PEDiN aus 2,2-Bis(brommethyl)-1,3-propandiol mit Silbernitrat (s. Kap. 2.2.4) nur bedingt mittels HPLC-Methode A überwacht werden, da Edukt und Produkt aufgrund ihres ähnlichen chromatographischen Verhaltens nicht basisliniengetrennt nachgewiesen werden konnten (s. Abb. 2.83). Eine Reaktionskontrolle war jedoch auch auf anderem Wege möglich (Auswaage des ausgefallenen Silberbromids), so daß das Trennsystem nicht weiter optimiert und nur zur groben Abschätzung des Umsatzes verwendet wurde.

Methode B:

Diese Methode wurde für die Trennung von 1,2-GDN und 1,3-GDN von ihren bromhaltigen Ausgangsverbindungen 2,3-Dibrompropanol (**73**) und 1,3-Dibrompropanol (**75**) entwickelt (s. Kap. 2.2.6 und 2.2.7).

Sowohl 1,2-GDN als auch 1,3-GDN konnten, wie in den Abbildungen 2.96 und 2.100 dargestellt, jeweils basisliniengetrennt von ihren Ausgangsstoffen detektiert werden. Eine Methodenoptimierung hinsichtlich Peaksymmetrie war auch hier nicht erforderlich, da nur qualitative Aussagen zur Umsetzung getroffen werden sollten. Eine Übersicht der Retentionszeiten der Edukte und Produkte ist in Tab. 4.2 zu finden:

Substanz	Retentionszeit in [min]
1,2-GDN	11,4
73	14,0
1,3-GDN	9,6
75	13,7

Tab. 4.2: Retentionszeiten der Verbindungen 1,2-GDN, 1,3-GDN, **73** und **75** unter den Bedingungen der Methode B

5.1.5 Kernresonanzspektroskopie

Die ^1H -, ^{13}C -, DEPT-, C,H-COSY-, HMBC- und HMQC-Spektren wurden am Institut für Organische Chemie der FSU Jena an einem AvanceTM 200-, AvanceTM 250- und einem AvanceTM 400 MHz - Spektrometer der Firma Bruker biospin (Karlsruhe) aufgenommen. Als Lösungsmittel fanden CDCl_3 , $[\text{D}_6]$ -DMSO und in seltenen Fällen MeOD Anwendung. Ein D_2O -Austausch wurde jeweils am Institut für Organische Chemie mit D_2O durchgeführt.

5.1.6 IR-Spektroskopie

Die synthetisierten Festsubstanzen wurden als KBr-Preßlinge entweder an einem Nicolet[®] Magma-IRTM FT-IR Spectrometer (System 550) oder einem Nicolet[®] Avatar[®] 370 der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) vermessen. Die erhaltenen Öle wurden als dünner Film auf KBr-Platten aufgetragen und anschließend analysiert.

5.1.7 Schmelzpunktbestimmung

Die Schmelzpunkte der synthetisierten Feststoffe wurden an einem Melting Point Apparatus der Firma Gallenkamp (UK) bestimmt und sind unkorrigiert.

5.1.8 Massenspektrometrie

Die Messungen wurden am Institut für anorganische Chemie der FSU Jena durchgeführt. Für die hochauflösenden Massenspektren wurde ein FinniganTM MAT 95 XL und für die EI-Spektren ein FinniganTM SSQ 710 jeweils von der Firma Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) verwendet.

5.1.9 Elementaranalyse

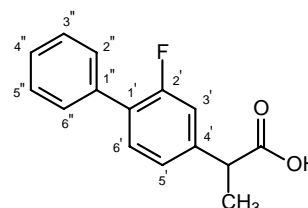
Zur Ermittlung der elementaranalytischen Daten wurde ein Hereaus Vario EL III (CHNOS Elementaranalysator) der Firma Elementar Analysensysteme GmbH Hanau im Institut für Organische Chemie der FSU Jena eingesetzt.

5.2 Synthesen

5.2.1 Vergleichsmonographien

5.2.1.1 Flurbiprofen

MG: $C_{15}H_{13}FO_2$ (244,27 g/mol)



R_f-Wert: 0,17 - 0,47 (Ether) verbreitert

0,22 (Hexan/Ethylacetat 60/40) verbreitert

0,27 (Hexan/Ethylacetat 50/50) verbreitert

0,79 (EtOH)

IR (KBr, cm^{-1}): 3167, 1733, 1701, 1483, 1422, 1179, 761, 704

GC/MS: t_R = 16.78 min

m/z (% rel. Int.) = 244 $[M]^{+*}$ (51.2), 199 (100.0), 184 (14.2), 183 (17.0), 179 (14.0), 178 (21.1), 170 (7.9), 152 (6.2), 133 (2.2), 98 (2.2), 85 (2.6), 77 (5.0), 63 (1.3), 51 (2.8)

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.60	d ($J = 7.3$ Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.83	q ($J = 7.3$ Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
7.16 – 7.23	m	2 H	arom.
7.37 – 7.59	m	6 H	arom.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$):

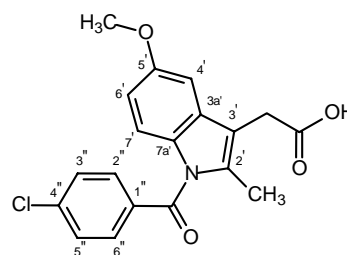
δ (ppm)	Zuordnung
18.01	Ph-CH-CH ₃
44.88	Ph-CH-CH ₃
115.22	arom. (3')
115.59	arom. (3')
123.71	arom. (5')
127.73	arom. (4'')
128.07	arom. (1')
128.29	arom. (1')

δ (ppm)	Zuordnung
128.47	arom. (3'',5'')
128.98	arom. (2'',6'')
130.91	arom. (6')
135.42	arom. (1'')
140.93	arom. (4')
157.73	arom. (2')
161.68	arom. (2')
180.35	COOH

5.2.1.2 Indometacin

MG: C₁₉H₁₆ClNO₄ (357,79 g/mol)

R_f-Wert: 0,10 (Hexan/Ethylacetat 40/60)
0,10 (Hexan/Ethylacetat 60/40)



IR (KBr, cm⁻¹): 3370, 2920, 2626, 2556, 1714, 1480, 1220, 1068, 1027, 926, 840, 752

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.20	s	3 H	CH ₃
3.65	s	2 H	CH ₂ -COOH
3.75	s	3 H	OCH ₃
6.67 – 6.72	dd (<i>J</i> = 9.0, 2.5 Hz)	1 H	arom. (6')
6.92	d (<i>J</i> = 8.9 Hz)	1 H	arom. (7')
7.03	d (<i>J</i> = 2.5 Hz)	1 H	arom. (4')
7.60 – 7.68	mc	4 H	arom. (2'', 3'', 5'', 6'')

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
13.10	CH ₃	130.67	arom. (3a')
29.47	CH ₂ -COOH	131.06	arom. (2'', 6'')
55.33	OCH ₃	134.08	arom. (1'')
101.65	arom. (4')	135.09	arom. (4'')
111.22	arom. (6')	137.56	arom. (7a')
113.37	arom. (3')	155.49	arom. (5')
114.51	arom. (7')	167.80	N-CO
128.99	arom. (3'', 5'')	172.01	COOH
130.16	arom. (2')		

5.2.2 Monographien

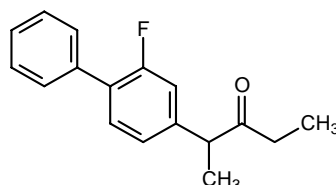
(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)pentan-3-on (3)

Es wird zunächst eine Grignard-Verbindung hergestellt aus 0,61 g (25,0 mmol) Magnesium und 2,72 g (25,0 mmol) Ethylbromid in 18 ml trockenem Ether und anschließend in Anteilen 2,38 g (13,0 mmol) wasserfreies Cadmiumchlorid zugefügt. Man läßt die Reaktionslösung eine Stunde rühren und dampft das Lösungsmittel bis auf ein Volumen von etwa 1-2 ml im Vakuum ab. Der graubraune, gallertartige Rückstand wird mit 10 ml Benzol versetzt und der Ether vollständig im Vakuum entfernt. Zu der erhaltenen Suspension wird nun über 10 Minuten mittels Tropftrichter eine Lösung aus 5,24 g (20,0 mmol) frisch hergestelltem **27** in 10 ml Benzol unter Rühren und Eiskühlung langsam

zugetropft. Das Reaktionsgemisch läßt man noch 3 Stunden bei Raumtemperatur rühren und gießt es anschließend in eine Mischung aus 10 ml eiskaltem Wasser und 15 ml verdünnter Salzsäure. Nach der Zugabe von 60 ml Benzol wird die organische Phase 4x mit je 50 ml Wasser und 2x mit 50 ml verdünnter Natriumhydroxidlösung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt und das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft. Der ölige Rückstand wird mit 2,17 g (38,7 mmol) Kaliumhydroxid in 3 ml Wasser sowie mit 5,6 ml Ethanol versetzt und 2 Stunden zum Rückfluß erhitzt. Anschließend verdünnt man den Ansatz mit 40 ml Wasser und extrahiert die entstehende Suspension 6x mit je 50 ml Ether. Die organischen Phasen werden vereinigt und mit Wasser neutral gewaschen. Nach Abtrennen der organischen Phase, Trocknen über Magnesiumsulfat, Filtrieren und Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man ein gelbes Öl, welches mit Toluol säulenchromatographisch gereinigt werden kann.

Ausbeute: 1,55 g; 30 %; farbloses Öl

MG: C₁₇H₁₇FO (256,32 g/mol)



R_f-Wert: 0,37 (Toluol)

IR (KBr, cm⁻¹): 2977, 1717, 1486, 1413, 1131, 916, 767, 701

GC/MS: t_R = 15.57 min

m/z (% rel. Int.) = 256 [M]⁺ (16.8), 199 (100.0), 184 (11.1), 183 (14.0), 179 (11.3), 178 (17.1), 170 (5.9), 152 (3.9), 133 (2.0), 101 (1.1), 98 (0.9), 77 (3.6), 57 (38.4)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.04	t (J = 7.3 Hz)	3 H	CO-CH ₂ -CH ₃
1.45	d (J = 7.1 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
2.39 – 2.49	dq (J = 17.9, 7.3 Hz)	1 H	CO-CHH-CH ₃
2.46 – 2.56	dq (J = 17.9, 7.3 Hz)	1 H	CO-CHH-CH ₃
3.83	q (J = 7.1 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
7.04 – 7.11	m	2 H	arom.
7.36 – 7.57	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
7.94	CO-CH ₂ -CH ₃	128.49	arom. (3'',5'')
17.52	Ph-CH-CH ₃	128.95	arom. (2'',6'')
34.49	CO-CH ₂ -CH ₃	131.07	arom. (6')
52.07	Ph-CH-CH ₃	135.41	arom. (1'')

115.37	arom. (3')	142.22	arom. (4')
115.60	arom. (3')	158.61	arom. (2')
123.85	arom. (5')	161.08	arom. (2')
127.72	arom. (4'')	210.86	CO
127.84	arom. (1')		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	79.41	6.42	-
berechnet für C ₁₇ H ₁₇ FO x 1/3 H ₂ O	79.66	6.69	-

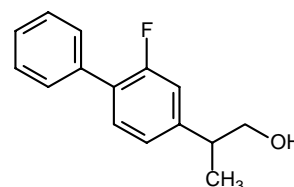
(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propan-1-ol (4)

2,62 g (9,6 mmol) **23** werden nach Adams *et al.* [1977] in 15 ml trockenem Ether gelöst und vorsichtig über 7 min zu einer Lösung aus 0,25 g (6,6 mmol) Lithiumaluminiumhydrid in 15 ml trockenem Ether unter Rühren zugetropft. Nach vollständigem Abklingen der exothermen Reaktion wird die Lösung unter Rückfluß eine Stunde zum Sieden erhitzt. Anschließend versetzt man das Reaktionsgemisch mit 10 ml feuchtem Ether, 10 ml Wasser und gießt die Lösung in eine Mischung aus Eis und verdünnter Schwefelsäure. Nach der Phasentrennung extrahiert man 4x mit je 40 ml Ether. Die organischen Extrakte werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft. Der verbleibende weiße Feststoff wird im Vakuum getrocknet.

Ausbeute: 2,04 g; 92 %; weißer Feststoff

MG: C₁₅H₁₅FO (230,28 g/mol)

Schmelzpunkt: 60°C (59-60°C [Griesbach, 1997])



R_f-Wert: 0,67 (Ether)

IR (KBr, cm⁻¹): 3253, 2924, 2870, 1483, 1416, 1128, 1024, 760, 695

GC/MS: t_R = 19.31 min

m/z (% rel. Int.) = 230 [M]⁺ (30.3), 199 (100.0), 184 (15.3), 183 (20.5), 179 (16.0), 178 (25.1), 170 (10.2), 165 (3.4), 152 (6.7), 133 (4.2), 77 (9.0), 63 (2.2), 51 (5.8), 32 (35.3), 31 (8.9)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.24	d (<i>J</i> = 7.0 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
2.93	sext (<i>J</i> = 6.8, 7.0 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
3.68	d (<i>J</i> = 6.8 Hz)	2 H	CH ₂ -OH
6.95 – 7.05	m	2 H	arom.
7.25 – 7.49	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.50	Ph-CH-CH ₃	127.57	arom. (4'')
42.01	Ph-CH-CH ₃	128.46	arom. (3'', 5'')
68.43	CH ₂ -OH	128.95	arom. (2'', 6'')
114.82	arom. (3')	130.79	arom. (6')
115.18	arom. (3')	135.68	arom. (1'')
123.55	arom. (5')	145.55	arom. (4')
127.13	arom. (1')	157.87	arom. (2')
127.35	arom. (1')	161.82	arom. (2')

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	78.20	6.62	-
berechnet für C ₁₅ H ₁₅ FO	78.24	6.57	-

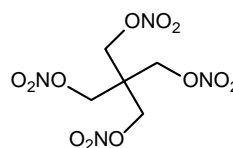
2,2-Bis[(nitrooxy)methyl]-1,3-di(nitrooxy)propan (PETN) (5)

0,50 g (3,67 mmol) Pentaerythritol werden vorsichtig in stark gekühlter 99%iger Salpetersäure (2,0 ml) bei –5 bis –10°C gelöst. Der sich bildende weiße, gummiartige Niederschlag wird etwa 3 Stunden stehen gelassen, anschließend mit wenig Wasser versetzt und weitere 3 Stunden stehen gelassen. Die verhärtete Kristallmasse wird vorsichtig, aber ausreichend mit Wasser gewaschen, in Aceton gelöst und anschließend auskristallisieren gelassen. Das ungelöste Pentaerythritol wird abfiltriert, das Filtrat mit Wasser verdünnt und das Aceton vorsichtig im Vakuum abgedampft. Der entstehende weiße Feststoff wird abfiltriert und mit Wasser befeuchtet aufbewahrt.

Ausbeute: 0,51 g; 44 %; weißer Feststoff

MG: C₅H₈N₄O₁₂ (316,14 g/mol)

Schmelzpunkt: 142,2 °C

(Lit. 142°C [*Brandstaetter-Kuhnert*, 1960])R_f-Wert: 0,88 (Toluol/Ethylacetat 80/20)

IR (KBr, cm^{-1}): 3430, 2907, 1648, 1274, 1005, 853, 748

^1H -NMR (250 MHz, $[\text{D}_6]$ -DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
4.69	s	8 H	$\text{CH}_2\text{-ONO}_2$

^{13}C -NMR ($[\text{D}_6]$ -DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung
41.27	$\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-CH}_2$
70.74	4x $\text{CH}_2\text{-ONO}_2$

2,2-Bis[(nitrooxy)methyl]-3-(nitrooxy)propan-1-ol (PETriN) (6)

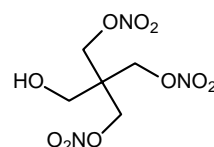
In Anlehnung an Hess *et al.* [2001] werden 2,25 g (7,12 mmol) PETN in 5 ml einer Mischung aus gleichen Teilen Ethanol und Dioxan suspendiert und unter Rühren zu einer siedenden Mischung aus je 50 ml Dioxan und Ethanol anteilsweise zugeben. Zu dieser Lösung wird nun über eine Stunde mittels Tropftrichter eine Lösung aus 0,72 g (14,38 mmol) Hydrazinhydrat in 30 ml Wasser unter Rühren und Rückfluß langsam zugetropft. Nach der vollständigen Zugabe erhitzt man das Reaktionsgemisch noch weitere 2 Stunden zum Rückfluß und läßt die Lösung anschließend auf Raumtemperatur abkühlen. Während der gesamten Reaktionszeit wird der Umsatz mittels HPLC-Methode A überwacht. Der Ansatz wird mit Wasser verdünnt und 6x mit je 50 ml Dichlormethan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel dampft man vorsichtig bei geringer Temperatur bis zu einem Restvolumen von etwa 1-2 ml ab, welches man anschließend im Stickstoffstrom entfernt. Die Aufreinigung des schwach gelben Öls erfolgt säulenchromatographisch mit EtOAc/Toluol (20/80) und entweder mit Kaliumiodid-Stärkelösung oder Diphenylamin in konz. Schwefelsäure als Detektionsreagenzien für die dünnschichtchromatographische Verlaufskontrolle.

Ausbeute: 1,29 g; 67 %; schwach gelbes Öl

MG: $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_{10}$ (271,14 g/mol)

R_f -Wert: 0,47 (Toluol/Ethylacetat 80/20)

0,83 (Hexan/Ethylacetat 30/70)



IR (KBr, cm^{-1}): 3604, 3424, 2971, 2905, 1638, 1477, 1277, 995, 856, 755

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.49	d ($J = 5.7$ Hz)	2 H	$\text{CH}_2\text{-OH}$
4.60	s	6 H	3x $\text{CH}_2\text{-ONO}_2$
5.32	t ($J = 5.7$ Hz)	1 H	OH

$^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$):

δ (ppm)	Zuordnung
42.66	$\text{CH}_2\text{-}\underline{\text{C}}\text{-CH}_2$
59.18	$\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-OH}$
71.20	3x $\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{-ONO}_2$

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	22.25	3.35	15.28
berechnet für $\text{C}_5\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_{10}$	22.15	3.35	15.50

2,2-Bis[(nitrooxy)methyl]-1,3-propandiol (PEDiN) (7)

a.) In Anlehnung an Hess *et al.* [2001] werden 2,43 g (7,69 mmol) PETN (5) in 5 ml einer Mischung aus gleichen Teilen Ethanol und Dioxan suspendiert und unter Rühren zu einer siedenden Mischung aus je 50 ml Dioxan und Ethanol anteilsweise zugeben. Zu dieser Lösung wird nun über 1,5 Stunden mittels Tropftrichter eine Lösung aus 3,09 g (61,73 mmol) Hydrazinhydrat in 30 ml Wasser unter Rühren und Rückfluß langsam zugetropft. Nach der vollständigen Zugabe erhitzt man das Reaktionsgemisch noch weitere 4,5 Stunden zum Rückfluß und läßt die Lösung anschließend auf Raumtemperatur abkühlen. Während der gesamten Reaktionszeit wird der Umsatz mittels HPLC-Methode A überwacht. Der Ansatz wird mit Wasser verdünnt und 6x mit je 50 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel anschließend unter Vakuum abgedampft. Die Aufreinigung des schwach gelben Öls erfolgt säulenchromatographisch mit Hexan/Ethylacetat (40/60) und Kaliumiodid-Stärkelösung als Detektionsreagenz für die dünnschichtchromatographische Verlaufskontrolle.

b.) 1,52 g (5,8 mmol) 2,2-Bis(brommethyl)-1,3-propandiol und 7,88 g (46,4 mmol) Silbernitrat werden in 30 ml trockenem Acetonitril gelöst und 14 Tage unter Rühren und Lichtschutz auf 60°C erhitzt. In regelmäßigen Abständen wird das ausgefallene Silberbromid abgefrittet (Porenweite 4) und der Rückstand mit trockenem Acetonitril gewaschen. Der Reaktionsverlauf wird über die Auswaage des abgetrennten Silberbromids überwacht. Nach 14 Tagen kühlt man die Lösung auf Raumtemperatur ab,

frittet das restliche Silberbromid ab und wäscht den Rückstand mit trockenem Acetonitril. Die Acetonitrilphase wird mehrfach mit einer gesättigten Natriumchloridlösung versetzt und das jeweils ausgefallene Silberchlorid abgefrittet. Das Filtrat extrahiert man 5x mit je 50 ml Ethylacetat. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende Öl wird in 50 ml Wasser aufgenommen und 2x mit je 100 ml Hexan und 6x mit je 50 ml Ether extrahiert. Die Hexanphasen werden verworfen und die Etherphasen mittels HPLC-Methode A kontrolliert. Die reinen Etherphasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft.

Ausbeute: a.) 0,75 g; 43 %; b.) 0,99 g, 75 %; schwach gelbes Öl

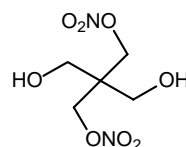
MG: $C_5H_{10}N_2O_8$ (226,14 g/mol)

R_f-Wert: 0,10 (Toluol/Ethylacetat 80/20)

0,35 (Hexan/Ethylacetat 50/50)

0,59 (Hexan/Ethylacetat 30/70)

0,75 (Ethylacetat)



IR (KBr, cm^{-1}): 3386, 2958, 2895, 1641, 1274, 1052, 983, 859

1H -NMR (250 MHz, $[D_6]$ -DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.40	d ($J = 5.6$ Hz)	4 H	2x $\underline{CH_2}$ -OH
4.52	s	4 H	2x $\underline{CH_2}$ -ONO ₂
4.95	t ($J = 5.6$ Hz)	2 H	2x OH

^{13}C -NMR ($[D_6]$ -DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung
44.28	$\underline{CH_2}$ - <u>C</u> - $\underline{CH_2}$ -OH
59.35	2x $\underline{CH_2}$ -OH
71.94	2x $\underline{CH_2}$ -ONO ₂

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	28.65	4.92	11.17
berechnet für $C_5H_{10}N_2O_8 \times \frac{1}{5} EtOAc$	28.58	4.80	11.49

2-Hydroxymethyl-2-[(nitrooxy)methyl]-1,3-propandiol (PEMN) (8)

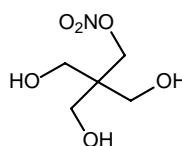
6,61 g (33,2 mmol) 2-Brommethyl-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol und 12,41 g (73,0 mmol) Silbernitrat werden in 130 ml trockenem Acetonitril gelöst und 7 Tage unter Rühren und Lichtschutz auf 50°C erhitzt. In regelmäßigen Abständen wird das ausgefallene Silberbromid abgefrittet (Porenweite 4) und der Rückstand mit trockenem Acetonitril gewaschen. Der Reaktionsverlauf wird über die Auswaage des abgetrennten Silberbromids überwacht. Nach 7 Tagen kühlt man die Lösung auf Raumtemperatur ab, frittet das restliche Silberbromid ab und wäscht den Rückstand mit trockenem Acetonitril. Die Acetonitrilphase wird mehrfach mit einer gesättigten Natriumchloridlösung versetzt und das jeweils ausgefallene Silberchlorid abgefrittet. Das Filtrat extrahiert man 10x mit je 100 ml Ethylacetat. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende Öl wird in 100 ml Wasser aufgenommen und 3x mit je 100 ml Hexan, 4x mit je 100 ml Ether, 4x mit je 100 ml Dichlormethan und 6x mit je 100 ml Ethylacetat extrahiert. Die Hexan-, Ether- und Dichlormethanphasen werden verworfen, die Ethylacetatphasen mittels HPLC-Methode A auf Verunreinigungen kontrolliert und anschließend die reinen Ethylacetatphasen vereinigt. Die vereinigten Ethylacetatphasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Der verbleibende weiße Feststoff kann aus Ether umkristallisiert werden.

Ausbeute: 1,35 g; 22,4 %; weißer, amorpher Feststoff

MG: C₅H₁₁NO₆ (181,15 g/mol)

Schmelzpunkt: 77,6 - 77,8°C (Ether)

(Lit. 76 - 78°C [Goldstein, 1966])



R_f-Wert: 0,13 (Hexan/Ethylacetat 30/70)

0,39 (Ethylacetat)

0,78 (Chloroform/Methanol 1/1)

IR (KBr, cm⁻¹): 3326, 2949, 2898, 1644, 1277, 1046, 865, 714, 606

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.35	d (<i>J</i> = 5.5 Hz)	6 H	3x CH ₂ -OH
4.43	s	2 H	CH ₂ -ONO ₂
4.53	t (<i>J</i> = 5.5 Hz)	3 H	3x OH

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung
45.25	CH ₂ - <u>C</u> -CH ₂ -OH
59.66	3x <u>CH</u> ₂ -OH
72.68	<u>CH</u> ₂ -ONO ₂

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	33.27	6.13	7.68
berechnet für C ₅ H ₁₁ NO ₆	33.15	6.12	7.73

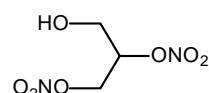
2-Nitrooxy-2-[(nitrooxy)methyl]ethan-1-ol (1,2-GDN) (10)

1,00 g (4,6 mmol) 2,3-Dibrompropan-1-ol und 7,8 g (45,9 mmol) Silbernitrat werden in 8 ml trockenem Acetonitril gelöst und 2 Tage unter Rühren, Stickstoffbegasung und Lichtschutz bei 50°C erhitzt. Während der gesamten Reaktionszeit wird der Umsatz mittels HPLC-Methode B überwacht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur frittet man das ausgefallene Silberbromid ab (Porenweite 4) und wäscht den Rückstand mit trockenem Acetonitril. Die Acetonitrilphase wird mehrfach mit einer gesättigten Natriumchloridlösung versetzt und das jeweils ausgefallene Silberchlorid abgefrittet. Das Filtrat extrahiert man 6x mit je 100 ml Ethylacetat. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft.

a.) Das verbleibende Öl wird in 60 ml Wasser aufgenommen und 3x mit je 60 ml Hexan, 4x mit je 60 ml Ether und 1x mit 60 ml Dichlormethan extrahiert. Die Hexanphasen werden verworfen, die Ether- und Dichlormethanphasen mittels HPLC-Methode B kontrolliert und anschließend die reinen Etherphasen vereinigt. Die vereinigten organischen Phasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Als Rückstand erhält man 0,51 g eines farblosen Öls (61 % Ausbeute).

b.) Neben der „fraktionierten Extraktion“ (a.) ist eine Säulenchromatographie mit Chloroform/Methanol (25/1) eine weitere Möglichkeit der Aufreinigung des Rückstandes der Ethylacetatphasen. Die Detektion erfolgt unter UV bei 254 nm nach Einsprühen der DC-Platten mit Kaliumiodid-Stärke-Lösung oder mit Diphenylamin in konz. Schwefelsäure. Die Methode führt zu einer geringfügig höheren Reinheit, aber auch zu niedrigeren Ausbeuten.

Ausbeute: 0,51 g; 61 %; farbloses Öl

MG: C₃H₆N₂O₇ (182,09 g/mol)

R_f-Wert: 0,38 (CHCl₃/MeOH 25/1)
0,41 (Hexan/Ethylacetat 60/40)

IR (KBr, cm⁻¹): 3592, 3389, 1638, 1274, 1062, 995, 853, 748

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.94	s	1 H	OH
3.88	mc	2 H	CH ₂ -OH
4.57 – 4.65	dd (<i>J</i> = 13.0, 6.5 Hz)	1 H	CHH-ONO ₂
4.75 – 4.81	dd (<i>J</i> = 13.0, 3.6 Hz)	1 H	CHH-ONO ₂
5.29	mc	1 H	CH-ONO ₂

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung
59.99	CH ₂ -OH
68.82	CH ₂ -ONO ₂
78.94	CH-ONO ₂

Elementaranalyse:

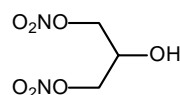
	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	20.19	3.47	15.01
berechnet für C ₃ H ₆ N ₂ O ₇	19.79	3.32	15.38

2-Nitrooxy-1-[(nitrooxy)methyl]ethan-1-ol (1,3-GDN) (11)

0,51 g (2,3 mmol) 1,3-Dibrompropan-2-ol und 1,42 g (8,4 mmol) Silbernitrat werden in 8 ml trockenem Acetonitril gelöst und 7 Tage unter Rühren und Lichtschutz bei 50°C erhitzt. Während der gesamten Reaktionszeit wird der Umsatz mittels HPLC-Methode B überwacht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur frittet man das ausgefallene Silberbromid ab (Porenweite 4) und wäscht den Rückstand mit trockenem Acetonitril. Die Acetonitrilphase wird mehrfach mit einer gesättigten Natriumchloridlösung versetzt und das jeweils ausgefallene Silberchlorid abgefrittet. Das Filtrat extrahiert man 3x mit je 100 ml Chloroform. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Es sind nach analytischer Kontrolle keine weiteren Aufreinigungsschritte nötig.

Ausbeute: 0,40 g; 94 %; schwach gelbes Öl

MG: C₃H₆N₂O₇ (182,09 g/mol)



R_F-Wert: 0,28 (CHCl₃/MeOH 25/1)
0,53 (Hexan/Ethylacetat 60/40)

IR (KBr, cm⁻¹): 3579, 3389, 2905, 1638, 1274, 1128, 1002, 859

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.57	d (<i>J</i> = 5.2 Hz)	1 H	OH
4.30	sext	1 H	CH-OH
4.50 – 4.57	dd (<i>J</i> = 11.7, 5.7 Hz)	2 H	2x CHH-ONO ₂
4.58 – 4.64	dd (<i>J</i> = 11.7, 4.6 Hz)	2 H	2x CHH-ONO ₂

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung
65.49	CH-OH
72.26	2x CH ₂ -ONO ₂

Elementaranalyse:

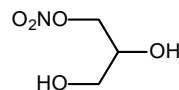
	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	19.83	3.38	15.10
berechnet für C ₃ H ₆ N ₂ O ₇	19.79	3.32	15.38

1-(Nitrooxy)methyl-1,2-ethandiol (1-GMN) (12)

1,00 g (6,5 mmol) 1-Brommethyl-1,2-ethandiol und 1,96 g (11,6 mmol) Silbernitrat werden in 12 ml trockenem Acetonitril gelöst und 10 Tage unter Rühren und Lichtschutz bei 70°C erhitzt. In regelmäßigen Abständen wird das ausgefallene Silberbromid abgefrittet und der Rückstand mit trockenem Acetonitril gewaschen. Nach 10 Tagen kühlt man die Lösung auf Raumtemperatur ab, frittet das restliche Silberbromid ab (Porenweite 4) und wäscht den Rückstand mit trockenem Acetonitril. Die Acetonitrilphase wird mehrfach mit einer gesättigten Natriumchloridlösung versetzt und jeweils das ausgefallene Silberchlorid abgefrittet. Das Filtrat extrahiert man 4x mit je 60 ml Ethylacetat. Die organischen Phasen werden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende, gelbliche Öl wird in 80 ml Wasser aufgenommen und 3x mit je 80 ml Hexan, 3x mit je 80 ml Ether, 3x mit je 80 ml Dichlormethan und 5x mit je 80 ml Ethylacetat extrahiert. Die Hexan-, Ether und Dichlormethanphasen werden verworfen. Die vereinigten Ethylacetatphasen werden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Als Rückstand erhält man ein farbloses bis schwach gelbliches Öl.

Ausbeute: 0,33 g; 37,4 %; schwach gelbes Öl

MG: C₃H₇NO₅ (137,09 g/mol)



R_f-Wert: 0,12 (Hexan/Ethylacetat 60/40)

IR (KBr, cm⁻¹): 3379, 2892, 1632, 1283, 1052, 862

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.28 – 3.35	dd (<i>J</i> = 11.1, 6.5 Hz)	1 H	CHH-OH
3.36 – 3.43	dd (<i>J</i> = 11.1, 5.0 Hz)	1 H	CHH-OH
3.74	mc	1 H	CH-OH
4.36 – 4.43	dd (<i>J</i> = 11.2, 3.3 Hz)	1 H	CHH-ONO ₂
4.56 – 4.62	dd (<i>J</i> = 11.2, 7.0 Hz)	1 H	CHH-ONO ₂
4.82	t (<i>J</i> = 5.7 Hz)	1 H	CH ₂ -OH
5.21	d (<i>J</i> = 5.4 Hz)	1 H	CH-OH

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung
62.76	CH ₂ -OH
68.35	CH-OH
75.68	CH ₂ -ONO ₂

Elementaranalyse:

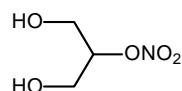
	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	25.83	5.59	9.46
berechnet für C ₃ H ₇ NO ₅ x ³ / ₁₁ H ₂ O x ¹ / ₂₂ EtOAc	26.17	5.46	9.59

2-Nitrooxy-1,3-propandiol (2-GMN) (13)

0,37 g (1,7 mmol) **89** werden bei Raumtemperatur in 2,5 ml Methanol gelöst und tropfenweise mit einer Lösung aus 0,13 g (3,3 mmol) Natriumhydroxid in 0,2 ml Wasser unter Rühren versetzt. Die Lösung wird noch 6 Minuten weitergerührt, anschließend mit konzentrierter HCl neutralisiert und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wird 3x mit je 10 ml Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft.

Rohausbeute: 0,17 g; 73 % (zu etwa 20% verunreinigt mit 1-GMN); schwach gelbes Öl

MG: C₃H₇NO₅ (137,09 g/mol)



IR (KBr, cm^{-1}): 3354, 2943, 1632, 1277, 1049, 856

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, $[\text{D}_6]\text{-DMSO}$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
3.49 - 3.67	m	4 H	2x $\text{CH}_2\text{-OH}$
5.02 - 5.11	t ($J = 5.9$ Hz) mc, überl.	3 H	2x OH CH-ONO_2

$^{13}\text{C-NMR}$ ($[\text{D}_6]\text{-DMSO}$):

δ (ppm)	Zuordnung
58.52	2x $\text{CH}_2\text{-OH}$
86.47	CH-ONO_2

Elementaranalyse:

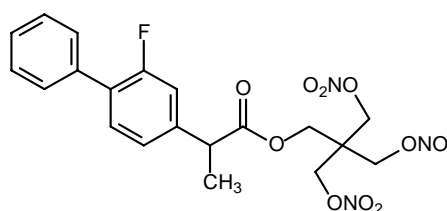
	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	26.32	5.33	10.07
berechnet für $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_5$	26.28	5.15	10.22

3-Nitrooxy-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (14)

4,50 g (18,4 mmol) Flurbiprofen werden in 70 ml trockenem Acetonitril gelöst und 3,59 g (22,1 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare, schwach gelbe Lösung wird eine Stunde bei Raumtemperatur unter Stickstoff stehengelassen bis keine CO_2 -Entwicklung mehr festzustellen ist. Zu dieser Lösung wird nun über 2 Stunden mittels Tropftrichter eine Lösung aus 0,50 g (1,8 mmol) PETriN (6) in 40 ml trockenem Acetonitril unter Rühren und Stickstoff langsam zugetropft. Die klare Lösung lässt man unter Stickstoff 5 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der Rückstand wird in 150 ml Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase 6x mit je 150 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, 2x mit je 150 ml 10%iger HCl-Lösung und 2x mit 150 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtrieren das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende gelbe Öl kann mit Hexan/Ethylacetat (80/20) säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,85 g; 93 %; farbloses Öl

MG: $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{FN}_3\text{O}_{11}$ (497,39 g/mol)



R_f-Wert: 0,44 (Hexan/Ethylacetat 80/20)
 0,59 (Hexan/Ethylacetat 70/30)
 0,85 (Hexan/Ethylacetat 50/50)

IR (KBr, cm⁻¹): 2981, 2914, 1746, 1641, 1483, 1416, 1274, 1176, 856, 704

¹H-NMR (400 MHz, [D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.47	d (<i>J</i> = 7.2 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.95	q (<i>J</i> = 7.2 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.16	d (<i>J</i> = 11.7 Hz)	1 H	COO-CHH
4.20	d (<i>J</i> = 11.7 Hz)	1 H	COO-CHH
4.59	d (<i>J</i> = 10.9 Hz)	3 H	3x CHH-ONO ₂
4.61	d (<i>J</i> = 10.9 Hz)	3 H	3x CHH-ONO ₂
7.22 – 7.27	m	2 H	arom.
7.38 – 7.53	m	6 H	arom.

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.79	CH ₃	128.27	arom. (4'')
41.72	CH ₂ -C-CH ₂ -OH	129.04	arom. (3'',5'')
44.35	Ph-CH-CH ₃	129.14	arom. (2'',6'')
62.48	COO-CH ₂	131.20	arom. (6')
71.15	CH ₂ -ONO ₂	135.34	arom. (1'')
115.45	arom. (3')	142.35	arom. (4')
115.69	arom. (3')	158.17	arom. (2')
124.35	arom. (5')	160.62	arom. (2')
127.45	arom. (1')	173.02	COO
127.58	arom. (1')		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	48.54	3.99	8.34
berechnet für C ₂₀ H ₂₀ FN ₃ O ₁₁	48.30	4.05	8.45

3-Nitrooxy-2-(nitrooxy)methyl-2-[(2*S*)-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyloxy]methyl}propyl (2*S*)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (15)

0,86 g (3,5 mmol) Flurbiprofen werden in 15 ml trockenem Acetonitril gelöst und 0,63 g (3,9 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare, schwach gelbe Lösung wird eine Stunde bei Raumtemperatur unter Stickstoff stehengelassen, bis keine CO₂-Entwicklung mehr festzustellen ist. Zu dieser Lösung wird nun über 1,5 Stunden mittels Tropftrichter eine Lösung aus 0,20 g (0,9 mmol) PEDiN (**7**) in 5 ml trockenem Acetonitril unter Rühren und Stickstoff langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter

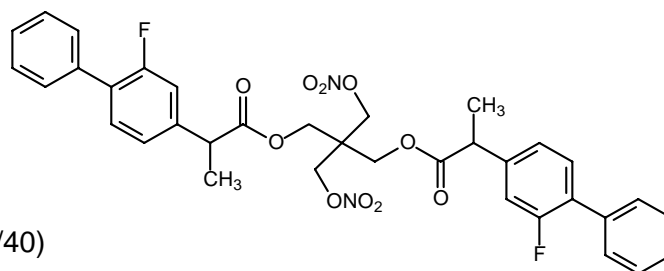
Stickstoff 13 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der ölige Rückstand wird in 50 ml Ether aufgenommen und die organische Phase 3x mit je 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, 3x mit je 60 ml 10%iger HCl-Lösung und 1x mit 60 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtrieren das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende gelbe Öl kann mit Hexan/Ethylacetat (60/40) säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,56 g; 93 %;

farbloses Öl

MG: $C_{35}H_{32}F_2N_2O_{10}$ (678,64 g/mol)

R_f -Wert: 0,77 (Hexan/Ethylacetat 60/40)



IR (KBr, cm^{-1}): 2984, 1749, 1644, 1483, 1416, 1274, 1173, 856, 770, 698

1H -NMR (250 MHz, $[D_6]$ -DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.42	d ($J = 7.1$ Hz)	6 H	2x Ph-CH-CH ₃
3.90	q ($J = 7.1$ Hz)	2 H	2x Ph-CH-CH ₃
4.00 – 4.12	m	4 H	2x COO-CH ₂
4.41 – 4.51	m	4 H	2x CH ₂ -ONO ₂
7.15 – 7.23	m	4 H	2x arom.
7.38 – 7.51	m	12 H	2x arom.

^{13}C -NMR ($[D_6]$ -DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.82	2x Ph-CH-CH ₃	127.55	2x arom. (1')
42.02	CH ₂ -C-CH ₂	128.26	2x arom. (4')
44.28	2x Ph-CH-CH ₃	129.08	2x arom. (2',3',5',6')
62.50	2x COO-CH ₂	131.16	2x arom. (6')
71.39	2x CH ₂ -ONO ₂	135.28	2x arom. (1')
115.38	2x arom. (3')	142.37	2x arom. (4')
115.76	2x arom. (3')	157.40	2x arom. (2')
124.31	2x arom. (5')	161.31	2x arom. (2')
127.34	2x arom. (1')	172.99	2x COO

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	62.01	4.68	3.98
berechnet für $C_{35}H_{32}F_2N_2O_{10}$	61.94	4.75	4.13

3-Hydroxy-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (16)

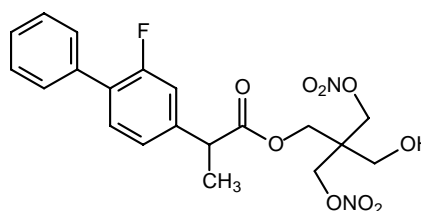
0,48 g (2,0 mmol) Flurbiprofen werden in 10 ml trockenem THF gelöst und 0,35 g (2,2 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare, schwach gelbe Lösung wird eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen, bis keine CO₂-Entwicklung mehr festzustellen ist und anschließend in einen Tropftrichter überführt. Diese Lösung wird nun über eine Stunde zu einer Lösung aus 0,50 g (2,2 mmol) PEDiN (**7**) in 5 ml trockenem THF unter Rühren langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter Feuchtigkeitsausschluß 14 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der ölige Rückstand wird in 50 ml Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase 3x mit je 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung, 2x mit je 60 ml 10%iger HCl-Lösung und 1x mit 60 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende orangebraune Öl kann mit Hexan/Ethylacetat (50/50) säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,19 g; 21 %; farbloses Öl

MG: C₂₀H₂₁FN₂O₉ (452,39 g/mol)

R_f-Wert: 0,62 (Hexan/Ethylacetat 60/40)

0,71 (Hexan/Ethylacetat 50/50)



IR (KBr, cm⁻¹): 3484, 2981, 2895, 1746, 1643, 1277, 1176, 862, 767, 698

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.45	d (<i>J</i> = 7.3 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.41	d (<i>J</i> = 5.7 Hz)	2 H	CH ₂ -OH
3.92	q (<i>J</i> = 7.3 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.03	d (<i>J</i> = 11.5 Hz)	1 H	COO-CH _H
4.09	d (<i>J</i> = 11.5 Hz)	1 H	COO-CH _H
4.39 – 4.55	m	4 H	2x CH ₂ -ONO ₂
5.18	t (<i>J</i> = 5.7 Hz)	1 H	CH ₂ -OH
7.19 – 7.26	m	2 H	arom.
7.36 – 7.53	m	6 H	arom.

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.92	Ph-CH-CH ₃	127.52	arom. (1')
43.39	CH ₂ -C-CH ₂ -OH	128.26	arom. (4'')

44.37	Ph- <u>C</u> H-CH ₃	129.10	arom. (2'',3'',5'',6'')
59.86	CH ₂ -OH	131.17	arom. (6')
63.02	COO- <u>C</u> H ₂	135.32	arom. (1'')
71.97	2x CH ₂ -ONO ₂	142.53	arom. (4')
115.37	arom. (3')	157.39	arom. (2')
115.74	arom. (3')	161.31	arom. (2')
124.35	arom. (5')	173.23	COO
127.30	arom. (1')		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	53.81	4.70	5.98
berechnet für C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O ₉ x 1/3 EtOAc	53.50	5.04	5.76

3-Nitrooxy-2,2-bis{[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyloxy]methyl}propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (17)

0,86 g (3,5 mmol) Flurbiprofen werden in 15 ml trockenem Acetonitril gelöst und 0,63 g (3,9 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare, schwach gelbe Lösung wird 45 Minuten bei Raumtemperatur unter Stickstoff stehengelassen, bis keine CO₂-Entwicklung mehr festzustellen ist. Zu dieser Lösung wird nun über 30 Minuten mittels Tropftrichter eine Lösung aus 0,16 g (0,9 mmol) PEMN (**8**) in 10 ml trockenem Acetonitril unter Rühren und Stickstoff langsam zugetropft. Die klare Lösung lässt man unter Stickstoff 3 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der Rückstand wird in 70 ml Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase 2x mit je 70 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 2x mit je 70 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Der verbleibende weiße Feststoff kann mit Hexan/Ethylacetat (60/40) säulenchromatographisch gereinigt werden.

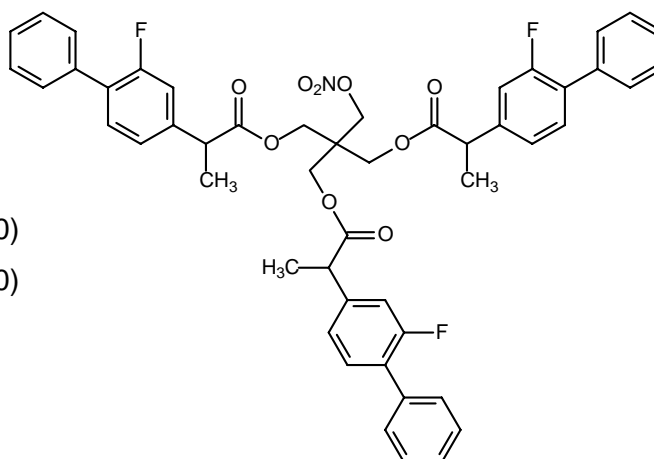
Ausbeute: 0,68 g; 90 %;

farbloses Öl

MG: C₅₀H₄₄F₃NO₉ (859,90 g/mol)

R_f-Wert: 0,81 (Hexan/Ethylacetat 60/40)

0,90 (Hexan/Ethylacetat 50/50)



IR (KBr, cm⁻¹): 3459, 2981, 1748, 1641, 1483, 1416, 1274, 1170, 764, 698

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.38	d (<i>J</i> = 7.3 Hz)	9 H	3x Ph-CH-CH ₃
3.80 – 3.89	q (<i>J</i> = 7.3 Hz) überl.	3 H	3x Ph-CH-CH ₃
3.89 – 3.97	m überl.	6 H	3x COO-CH ₂
4.30 – 4.40	m	2 H	CH ₂ -ONO ₂
7.10 – 7.20	m	6 H	3x arom.
7.34 – 7.50	m	18 H	3x arom.

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.87	3x Ph-CH-CH ₃	127.50	3x arom. (1')
42.35	CH ₂ -C-CH ₂	128.24	3x arom. (4'')
44.25	3x Ph-CH-CH ₃	129.08	3x arom. (2'',3'',5'',6'')
62.45	3x COO-CH ₂	131.13	3x arom. (6')
71.73	CH ₂ -ONO ₂	135.27	3x arom. (1'')
115.39	3x arom. (3')	142.36	3x arom. (4')
115.77	3x arom. (3')	157.38	3x arom. (2')
124.30	3x arom. (5')	161.30	3x arom. (2')
127.29	3x arom. (1')	172.94	3x COO

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	69.58	5.10	1.40
berechnet für C ₅₀ H ₄₄ F ₃ NO ₉	69.84	5.16	1.63

3-Nitrooxy-2-hydroxymethyl-2-[[[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyloxy]methyl]propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (18)

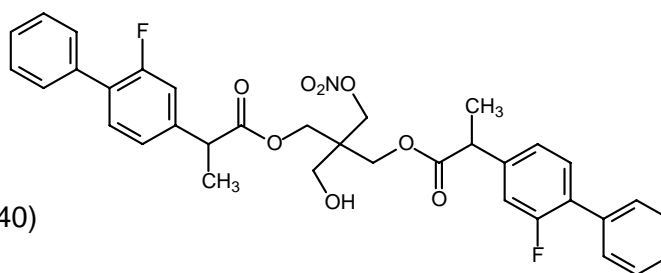
0,43 g (1,8 mmol) Flurbiprofen werden in 10 ml trockenem Acetonitril gelöst und 0,32 g (2,0 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare, schwach gelbe Lösung wird 40 Minuten bei Raumtemperatur unter Stickstoff stehengelassen, bis keine CO₂-Entwicklung mehr festzustellen ist. Zu dieser Lösung wird nun über 20 Minuten mittels Tropftrichter eine Lösung aus 0,16 g (0,9 mmol) PEMN (**8**) in 5 ml trockenem Acetonitril unter Rühren und Stickstoff langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter Stickstoff 5 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der Rückstand wird in 60 ml Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase 3x mit je 60 ml 10%iger HCl-Lösung, 3x mit je 60 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 2x mit je 60 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende farblose Öl kann mit Hexan/Ethylacetat (60/40) säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,25 g; 45 %;

farbloses Öl

MG: C₃₅H₃₃F₂NO₈ (633,65 g/mol)

R_f-Wert: 0,65 (Hexan/Ethylacetat 60/40)



IR (KBr, cm⁻¹): 3509, 2984, 1736, 1638, 1486, 1419, 1277, 1170, 872, 770, 701

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.40	d (J = 7.1 Hz)	6 H	2x Ph-CH-CH ₃
3.32 – 3.34	m überl.	2 H	CH ₂ -OH
3.82 – 3.89	q (J = 7.1 Hz) überl.	2 H	2x Ph-CH-CH ₃
3.89 – 4.00	m überl.	4 H	2x COO-CH ₂
4.31 – 4.35	d (J = 10.5 Hz)	1 H	CHH-ONO ₂
4.36 – 4.41	d (J = 10.5 Hz)	1 H	CHH-ONO ₂
5.03	t (J = 5.5 Hz)	1 H	OH
7.13 – 7.22	m	4 H	2x arom.
7.35 – 7.52	m	12 H	2x arom.

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
18.03	2x Ph-CH-CH ₃	127.45	2x arom. (1')
43.55	CH ₂ -C-CH ₂ -OH	128.25	2x arom. (4'')
44.35	2x Ph-CH-CH ₃	129.09	2x arom. (2'',3'',5'',6'')
59.85	CH ₂ -OH	131.13	2x arom. (6')
62.99	2x COO-CH ₂	135.31	2x arom. (1'')
72.29	CH ₂ -ONO ₂	142.55	2x arom. (4')
115.40	2x arom. (3')	157.38	2x arom. (2')
115.78	2x arom. (3')	161.29	2x arom. (2')
124.34	2x arom. (5')	173.16	2x COO
127.24	2x arom. (1')		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	66.08	5.29	2.29
berechnet für C ₃₅ H ₃₃ F ₂ NO ₈	66.34	5.25	2.21

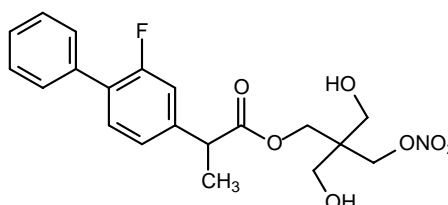
3-Hydroxy-2-hydroxymethyl-2-[(nitrooxy)methyl]propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-bi-phenyl-4-yl)propanoat (19)

0,58 g (2,2 mmol) Flurbiprofen werden in 10 ml trockenem Acetonitril gelöst und mit 0,43 g (2,7 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) versetzt. Die klare, schwach gelbe Lösung wird eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen, bis keine CO₂-Entwicklung mehr

festzustellen ist, und anschließend in einen Tropftrichter überführt. Diese Lösung wird nun über eine Stunde zu einer Lösung aus 0,43 g (2,4 mmol) PEMN (**8**) in 7 ml trockenem Acetonitril unter Rühren langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter Feuchtigkeitsausschluß und Stickstoffbegasung 2 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der ölige Rückstand wird in 10 ml Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase 2x mit je 30 ml 10%iger HCl-Lösung und 3x mit je 30 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende Öl kann mit Hexan/Ethylacetat (60/40) säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,04 g; 4 %; farbloses Öl

MG: C₂₀H₂₂FNO₇ (407,40 g/mol)



R_f-Wert: 0,21 (Hexan/Ethylacetat 60/40)

0,61 (Hexan/Ethylacetat 20/80)

IR (KBr, cm⁻¹): 2974, 1749, 1641, 1486, 1416, 1283, 1226, 1049, 862, 701

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.56	d (<i>J</i> = 7.3 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.78	q (<i>J</i> = 7.3 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
3.99 – 4.10	m	4 H	2x CH ₂ -OH
4.12	d (<i>J</i> = 11.5 Hz)	1 H	COO-CHH
4.20	d (<i>J</i> = 11.5 Hz)	1 H	COO-CHH
4.41	s	2 H	CH ₂ -ONO ₂
7.06 – 7.13	m	2 H	arom.
7.37 – 7.56	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.80	Ph-CH-CH ₃	128.23	arom. (1')
42.12	CH ₂ -C-CH ₂	128.44	arom. (3'',5'')
44.89	Ph-CH-CH ₃	128.94	arom. (2'',6'')
61.91	2x CH ₂ -OH	131.03	arom. (6')
62.33	COO-CH ₂	135.28	arom. (1'')
70.51	CH ₂ -ONO ₂	141.09	arom. (4')
114.99	arom. (3')	157.74	arom. (2')
115.18	arom. (3')	161.70	arom. (2')
123.37	arom. (5')	170.10	COO
127.74	arom. (4'')		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	60.11	6.83	2.36
berechnet für $C_{20}H_{22}FNO_7 \times EtOAc \times \frac{2}{3} \text{ Hexan}$	60.17	6.98	2.60

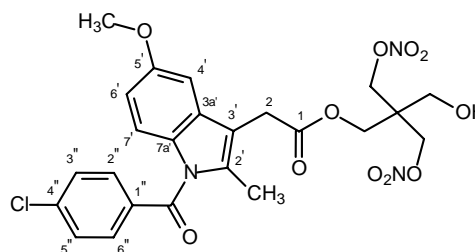
3-Hydroxy-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl [1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]acetat (20)

1,20 g (3,4 mmol) Indometacin werden in 20 ml trockenem THF gelöst und 1,08 g (6,7 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare Lösung wird eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen, bis keine CO₂-Entwicklung mehr festzustellen ist und anschließend in einen Tropftrichter überführt. Diese Lösung wird nun über 2 Stunden zu einer Lösung aus 0,76 g (3,4 mmol) PEDiN (**7**) in 10 ml trockenem THF unter Rühren langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter Feuchtigkeitsausschluß 4 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der ölige Rückstand wird in 50 ml Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase 4x mit je 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 1x mit 60 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende gelbe Öl kann mit Hexan/Ethylacetat (50/50) säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,32 g; 17 %; gelbes Öl

MG: C₂₄H₂₄ClN₃O₁₁ (565,92 g/mol)

R_f-Wert: 0,40 (Hexan/Ethylacetat 60/40)
0,61 (Hexan/Ethylacetat 50/50)



IR (KBr, cm⁻¹): 3484, 2968, 1743, 1638, 1483, 1280, 1065, 850, 755

¹H-NMR (400 MHz, [D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.23	s	3 H	CH ₃
3.42	d (<i>J</i> = 5.6 Hz)	2 H	CH ₂ -OH
3.76	s	3 H	OCH ₃
3.80	s	2 H	CH ₂ -COO
4.09	s	2 H	COO-CH ₂
4.48	d (<i>J</i> = 10.7 Hz)	2 H	2x CHH-ONO ₂
4.51	d (<i>J</i> = 10.7 Hz)	2 H	2x CHH-ONO ₂
5.17	t (<i>J</i> = 5.6 Hz)	1 H	OH
6.70 – 6.73	dd (<i>J</i> = 9.0, 2.4 Hz)	1 H	arom. (6')
6.92	d (<i>J</i> = 9.0 Hz)	1 H	arom. (7')

7.05	d ($J = 2.4$ Hz)	1 H	arom. (4')
7.63 – 7.68	mc	4 H	arom. (2'', 3'', 5'', 6'')

¹³C-NMR (250 MHz, [D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
12.96	CH ₃	129.00	arom. (3'', 5'')
29.13	C-CH ₂ -COO (2)	130.12	arom. (2')
42.90	CH ₂ -C-CH ₂ -OH	130.31	arom. (3a')
55.26	OCH ₃	131.05	arom. (2'', 6'')
59.27	CH ₂ -OH	134.01	arom. (1'')
62.28	CO-CH ₂ -C-CH ₂ OH	135.32	arom. (4'')
71.43	2x CH ₂ -ONO ₂	137.61	arom. (7a')
101.33	arom. (4')	155.57	C-OCH ₃ (5')
111.48	arom. (6')	167.76	N-CO
112.41	arom. (3')	170.04	COO
114.58	arom. (7')		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	50.94	4.20	7.26
berechnet für C ₂₄ H ₂₄ ClN ₃ O ₁₁	50.94	4.27	7.43

2-[1-(4-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]acetoxyloxy)methyl-3-nitrooxy-2-[(nitrooxy)methyl]propyl [1-(4-chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]acetat (21)

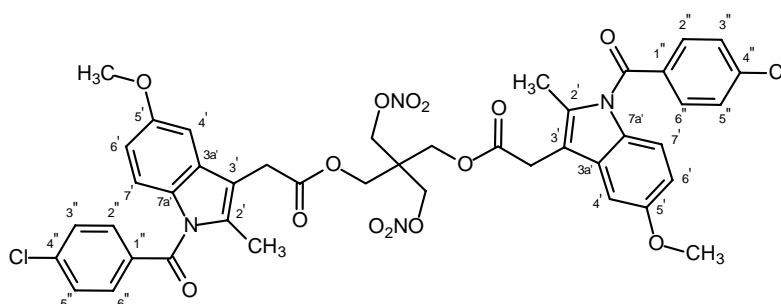
1,27 g (3,5 mmol) Indometacin werden in 25 ml trockenem THF gelöst und 0,63 g (3,9 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare, schwach gelbe Lösung wird eine Stunde bei Raumtemperatur unter Stickstoff stehengelassen, bis keine CO₂-Entwicklung mehr festzustellen ist. Zu dieser Lösung wird nun über 30 Minuten mittels Tropftrichter eine Lösung aus 0,20 g (0,9 mmol) PEDiN (**7**) in 5 ml trockenem THF unter Rühren und Stickstoff langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter Stickstoff 3 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der Rückstand wird in 60 ml Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase 2x mit je 80 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 2x mit je 80 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende schwach gelbe Öl kann mit Hexan/Ethylacetat (60/40) säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,33 g; 41 %;

gelbliches Öl

MG: $C_{43}H_{38}Cl_2N_4O_{14}$

(905,70 g/mol)



R_f-Wert: 0,84 (Hexan/Ethylacetat 50/50)

IR (KBr, cm^{-1}): 3452, 2926, 1742, 1679, 1641, 1473, 1273, 1141, 843

Hochauflösende MS: gemessen: 927.9
berechnet für $C_{43}H_{38}Cl_2N_4O_{14} \cdot Na$: 928

1H -NMR (400 MHz, $[D_6]$ -DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.19	s	6 H	2x CH ₃
3.73	s	6 H	2x OCH ₃
3.78	s	4 H	2x CH ₂ -COO
4.09	s	4 H	2x COO-CH ₂
4.47	s	4 H	2x CH ₂ -ONO ₂
6.68 – 6.71	dd ($J = 9.0, 2.4$ Hz)	2 H	2x arom. (6')
6.90	d ($J = 9.0$ Hz)	2 H	2x arom. (7')
7.02	d ($J = 2.4$ Hz)	2 H	2x arom. (4')
7.59 – 7.65	mc	8 H	2x arom. (2'', 3'', 5'', 6'')

^{13}C -NMR (400 MHz, $[D_6]$ -DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
13.43	2x CH ₃	129.48	2x arom. (3'', 5'')
29.54	2x C-CH ₂ -COO	130.68	2x arom. (2')
42.20	CH ₂ -C-CH ₂	130.81	2x arom. (3a')
55.78	2x OCH ₃	131.55	2x arom. (2'', 6'')
62.23	CO-CH ₂ -C-CH ₂ -OC	134.52	2x arom. (1'')
71.28	2x CH ₂ -ONO ₂	135.94	2x arom. (4'')
101.88	2x arom. (4')	138.15	2x arom. (7a')
111.96	2x arom. (6')	156.13	2x C-OCH ₃ (5')
112.78	2x arom. (3')	168.26	2x N-CO
115.13	2x arom. (7')	170.38	2x COO

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	56.25	4.72	6.11
berechnet für $C_{43}H_{38}Cl_2N_4O_{14} \cdot \frac{2}{3} H_2O$	56.28	4.32	6.11

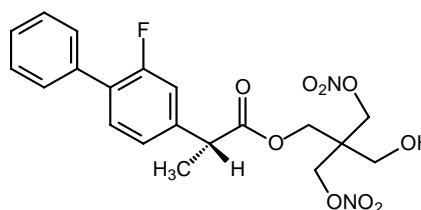
3-Hydroxy-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl (2*R*)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (22)

0,39 g (1,6 mmol) *R*-Flurbiprofen werden in 7 ml trockenem Acetonitril gelöst und 0,30 g (1,9 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare, schwach gelbe Lösung wird eine Stunde bei Raumtemperatur unter Stickstoff stehengelassen und anschließend in einen Tropftrichter überführt. Diese Lösung wird nun über 3 Stunden zu einer Lösung aus 0,41 g (1,8 mmol) PEDiN (**7**) in 8 ml trockenem Acetonitril unter Rühren und Stickstoff langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter Feuchtigkeitsausschluß 20 Stunden bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Das verbleibende hellgelbe Öl wird in 70 ml Ethylacetat aufgenommen und die organische Phase 3x mit je 80 ml 10%iger HCl-Lösung und 2x mit je 80 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende gelbliche Öl kann mit Hexan/Ethylacetat (60/40) säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,45 g; 62 %; farbloses Öl

MG: C₂₀H₂₁FN₂O₉ (452,39 g/mol)

R_f-Wert: 0,61 (Hexan/Ethylacetat 60/40)



IR (KBr, cm⁻¹): 3481, 2981, 1743, 1638, 1274, 1179, 859, 701

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.45	d (<i>J</i> = 7.3 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.41	d (<i>J</i> = 5.5 Hz)	2 H	CH ₂ -OH
3.92	q (<i>J</i> = 7.3 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.03	d (<i>J</i> = 11.5 Hz)	1 H	COO-CHH
4.09	d (<i>J</i> = 11.5 Hz)	1 H	COO-CHH
4.42 – 4.52	m	4 H	2x CH ₂ -ONO ₂
5.18	t (<i>J</i> = 5.5 Hz)	1 H	CH ₂ -OH
7.19 – 7.26	m	2 H	arom.
7.36 – 7.54	m	6 H	arom.

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.92	Ph-CH-CH ₃	127.51	arom. (1')
43.38	CH ₂ -C-CH ₂ -OH	128.25	arom. (4'')
44.37	Ph-CH-CH ₃	129.10	arom. (2'', 3'', 5'', 6'')
59.86	CH ₂ -OH	131.16	arom. (6')
63.01	COO-CH ₂	135.30	arom. (1'')

71.97	2x CH ₂ -ONO ₂	142.53	arom. (4')
115.36	arom. (3')	157.39	arom. (2')
115.74	arom. (3')	161.31	arom. (2')
124.35	arom. (5')	173.22	COO
127.30	arom. (1')		

Elementaranalyse:

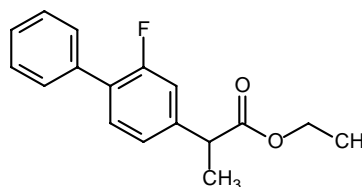
	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	52.85	4.69	6.11
berechnet für C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O ₉	53.10	4.68	6.19

Ethyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (23)

4,00 g (16,4 mmol) Flurbiprofen werden nach Adams *et al.* [1977] in 30 ml abs. Ethanol gelöst und mit 1 ml 96%iger Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wird 21 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, abkühlen gelassen, mit 50 ml Wasser verdünnt und 4x mit je 50 ml Ether extrahiert. Die Etherphasen werden vereinigt und anschließend 3x mit je 50 ml 10%iger Natriumcarbonat-Lösung gewaschen. Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat, Filtrieren und Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum führt zu einem schwach gelben Öl, welches nach Analyse nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Ausbeute: 3,92 g; 88 %; schwach gelbes Öl

MG: C₁₇H₁₇FO₂ (272,32 g/mol)



R_f-Wert: 0,39 (Toluol)

0,86 (EtOH)

IR (KBr, cm⁻¹): 2987, 1736, 1413, 1185, 770, 698

GC/MS: t_R = 19.99 min

m/z (% rel. Int.) = 272 [M]⁺ (21.5), 199 (100.0), 184 (10.2), 183 (12.9), 179 (10.7), 178 (17.2), 171 (3.3), 170 (6.6), 152 (4.3), 133 (2.4), 101 (1.6), 99 (2.8), 77 (5.8), 51 (3.3)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.28	t (J = 7.1 Hz)	3 H	COO-CH ₂ -CH ₃
1.57	d (J = 7.1 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.78	q (J = 7.1 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.13 – 4.26	mc	2 H	COO-CH ₂ -CH ₃
7.13 – 7.21	m	2 H	arom.
7.36 – 7.59	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
14.11	O-CH ₂ -CH ₃	128.41	arom. (3'',5'')
18.43	Ph-CH-CH ₃	128.93	arom. (2'',6'')
45.06	Ph-CH-CH ₃	130.74	arom. (6')
60.96	O-CH ₂ -CH ₃	135.54	arom. (1'')
115.02	arom. (3')	141.98	arom. (4')
115.40	arom. (3')	157.70	arom. (2')
123.50	arom. (5')	161.65	arom. (2')
127.62	arom. (4'')	173.97	COO
127.84	arom. (1')		

Elementaranalyse:

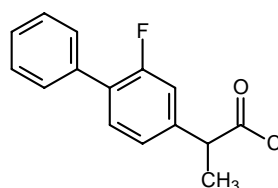
	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	74.90	6.32	-
berechnet für C ₁₇ H ₁₇ FO ₂	74.98	6.29	-

(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoylchlorid (27)

3,81 g (30,0 mmol) Oxalylchlorid werden nach Garvey *et al.* [1997] in 30 ml Dichlormethan gelöst, unter Stickstoffbegasung 5 Minuten gerührt und anschließend auf 0°C gekühlt. Nach Zugabe von 10 Tropfen trockenem DMF wird weitere 5 Minuten gerührt. Zu dieser Lösung tropft man unter Rühren und Stickstoffbegasung eine Lösung aus 3,00 g (12,3 mmol) Flurbiprofen in 30 ml Dichlormethan über 25 Minuten zu. Das Reaktionsgemisch wird noch 5 Minuten unter Eiskühlung gerührt, anschließend auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Nach Abdampfen des organischen Lösungsmittels im Vakuum erhält man das Produkt in Form gelber Kristalle. Eine weitere Aufreinigung ist nicht erforderlich.

Ausbeute: 3,2 g; 99 %; gelbe Kristalle

MG: C₁₅H₁₂ClFO (262,71 g/mol)

**Methyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (28)**

2,00 g (8,2 mmol) Flurbiprofen werden nach Pozzoli *et al.* [1996] in 2 ml Toluol gelöst und mit 1,32 g abs. Methanol sowie 0,02 g 96%ige Schwefelsäure bei Raumtemperatur versetzt. Die Lösung wird 3 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, abkühlen gelassen und mit 5%iger NaOH-Lösung alkalisiert. Nach der Phasentrennung nimmt man die Toluolphase ab und wäscht 3x mit je 20 ml Wasser. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter

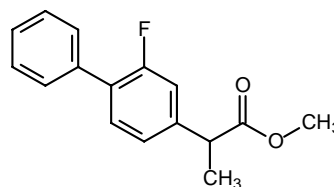
Vakuum abgedampft. Das verbleibende Öl wird bei Raumtemperatur stehengelassen und der sich innerhalb eines Tages bildende weiße Feststoff aus Isopropanol umkristallisiert.

Ausbeute: 1,29 g; 61 %; weißer Feststoff

MG: $C_{16}H_{15}FO_2$ (258,29 g/mol)

Schmelzpunkt: 44°C (Isopropanol)

(Lit. 50-52°C [Pozzoli, 1996])



R_f -Wert: 0,84 (EtOH)

IR (KBr, cm^{-1}): 2984, 2949, 1730, 1413, 1201, 919, 695

GC/MS: t_R = 19.44 min

m/z (% rel. Int.) = 258 $[M]^{+}$ (28.8), 199 (100.0), 184 (11.8), 183 (14.7), 179 (12.3), 178 (19.3), 170 (7.8), 152 (4.6), 133 (2.8), 99 (2.3), 98 (2.6), 85 (3.0), 77 (6.2), 59 (4.4), 51 (4.1), 32 (1.8)

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.47	d ($J = 7.1$ Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.63	s	3 H	COOCH ₃
3.69	q ($J = 7.1$ Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
7.02 – 7.09	m	2 H	arom.
7.25 – 7.48	m	6 H	arom.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
18.41	Ph-CH-CH ₃	128.42	arom. (3'',5'')
44.91	Ph-CH-CH ₃	128.93	arom. (2'',6'')
52.18	COO-CH ₃	130.81	arom. (6')
115.04	arom. (3')	135.48	arom. (1'')
115.41	arom. (3')	141.80	arom. (4')
123.50	arom. (5')	157.71	arom. (2')
127.64	arom. (4'')	161.66	arom. (2')
127.73	arom. (1')	174.42	COO
127.95	arom. (1')		

Elementaranalyse:

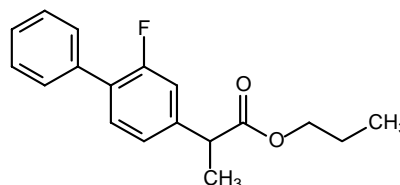
	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	74.38	5.79	-
berechnet für $C_{16}H_{15}FO_2$	74.40	5.85	-

Propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (29)

1,50 g (6,1 mmol) Flurbiprofen werden in 1,86 g (31,0 mmol) n-Propanol gelöst und mit 0,12 g 96%iger Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wird 4 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, abkühlen gelassen, mit 50 ml Wasser verdünnt und mit 5%iger Natriumhydroxidlösung alkalisiert. Die wässrige Phase extrahiert man 4x mit je 50 ml Ether. Die Etherphasen werden vereinigt und anschließend 2x mit je 50 ml Wasser gewaschen. Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat, Filtrieren und Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum führt zu einem farblosen Öl, welches nach Analyse nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Ausbeute: 1,58 g; 90 %; farbloses Öl

MG: C₁₈H₁₉FO₂ (286,35 g/mol)



R_f-Wert: 0,82 (EtOH)

IR (KBr, cm⁻¹): 2971, 1733, 1489, 1413, 1182, 764, 695

GC/MS: t_R = 17.40 min

m/z (% rel. Int.) = 286 [M]⁺* (30.2), 199 (100.0), 184 (8.2), 183 (9.7), 179 (8.5), 178 (12.6), 170 (4.3), 165 (0.9), 152 (2.4), 133 (1.1), 99 (2.1), 77 (1.8), 51 (0.8)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.93	t (J = 7.4 Hz)	3 H	COO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
1.58	d (J = 7.1 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
1.67	sext (J = 7.4, 6.7 Hz)	2 H	COO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
3.79	q (J = 7.1 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.10	t (J = 6.7 Hz)	2 H	COO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
7.14 – 7.21	m	2 H	arom.
7.36 – 7.60	m	6 H	arom.

¹³C-NMR ([D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
10.53	O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	128.25	arom. (4'')
18.70	Ph-CH-CH ₃	129.04	arom. (3'',5'')
21.91	O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	129.15	arom. (2'',6'')
44.42	Ph-CH-CH ₃	131.19	arom. (6')
66.30	O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	135.25	arom. (1'')
115.38	arom. (3')	142.98	arom. (4')
115.75	arom. (3')	157.39	arom. (2')
124.39	arom. (5')	161.30	arom. (2')

127.14	arom. (1')	173.80	COO
127.36	arom. (1')		

Elementaranalyse:

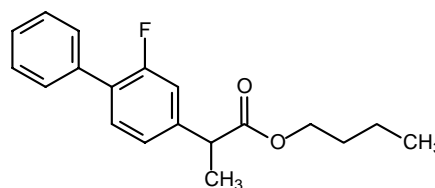
	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	75.52	6.65	-
berechnet für C ₁₈ H ₁₉ FO ₂	75.50	6.69	-

Butyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (30)

1,50 g (6,1 mmol) Flurbiprofen werden in 2,29 g (30,9 mmol) Butanol gelöst und mit 0,14 g 96%iger Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wird 4,5 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, abkühlen gelassen, mit 50 ml Wasser verdünnt und mit 5%iger Natriumhydroxidlösung alkalisiert. Die wässrige Phase extrahiert man 4x mit je 50 ml Ether. Die Etherphasen werden vereinigt und anschließend 2x mit je 50 ml Wasser gewaschen. Trocknen der organischen Phase über Magnesiumsulfat, Filtrieren und Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum führt zu einem farblosen Öls, welches nach Analyse nicht weiter aufgereinigt werden muß.

Ausbeute: 1,58 g; 86 %; farbloses Öl

MG: C₁₉H₂₁FO₂ (300,37 g/mol)



R_f-Wert: 0,56 (Toluol)

IR (KBr, cm⁻¹): 2962, 2930, 1733, 1486, 1420, 1179, 767, 698

GC/MS: t_R = 18.25 min

m/z (% rel. Int.) = 300 [M]⁺ (22.9), 244 (2.0), 199 (100.0), 184 (7.5), 183 (8.8), 179 (7.6), 178 (11.8), 170 (3.7), 152 (2.2), 133 (1.1), 99 (2.0), 77 (2.0), 57 (6.0)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.92	t (J = 7.6 Hz)	3 H	O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
1.35	sext (J = 7.6, 7.3 Hz)	2 H	O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
1.56	d (J = 7.1 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
1.62	quint (J = 7.3, 6.8 Hz)	2 H	O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
3.77	q (J = 7.1 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.12	t (J = 6.8 Hz)	2 H	O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃
7.14 – 7.19	m	2 H	arom.
7.36 – 7.58	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
13.68	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	127.81	arom. (1')
18.37	Ph-CH-CH ₃	128.46	arom. (3'',5'')
19.07	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	128.97	arom. (2'',6'')
30.58	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₃	130.75	arom. (6')
45.13	Ph-CH-CH ₃	135.55	arom. (1'')
64.90	COO-CH ₂ -CH ₂	142.00	arom. (4')
115.13	arom. (3')	158.44	arom. (2')
115.37	arom. (3')	160.91	arom. (2')
123.56	arom. (5')	174.09	COO
127.66	arom. (4'')		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	76.05	7.14	-
berechnet für C ₁₉ H ₂₁ FO ₂	75.98	7.05	-

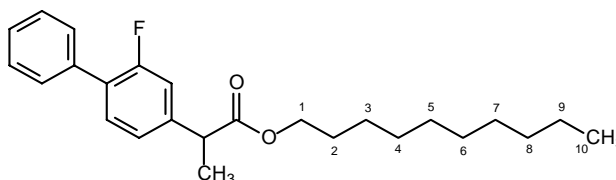
Decyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (31)

0,20 g (0,8 mmol) Flurbiprofen werden in 15 ml Toluol gelöst und mit 0,13 g (0,8 mmol) Decanol sowie 2 Tropfen 96%iger Schwefelsäure versetzt. Die Lösung wird 3 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, abkühlen gelassen, mit 20 ml Wasser verdünnt und mit 5%iger Natriumhydroxidlösung alkalisiert. Nach der Phasentrennung extrahiert man die wässrige Phase 1x mit 30 ml Toluol und 3x mit je 30 ml Ether. Die Toluol- und Etherphasen werden separat 2x mit je 50 ml Wasser neutral gewaschen. Trocknen der organischen Phasen über Magnesiumsulfat, Filtrieren und Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum führt zu einem farblosen Öl, welches mit Toluol säulenchromatographisch aufgereinigt werden kann.

Ausbeute: 0,18 g; 57 %;

farbloses Öl

MG: C₂₅H₃₃FO₂ (384,53 g/mol)



R_f-Wert: 0,69 (Toluol)

IR (KBr, cm⁻¹): 2920, 2851, 1733, 1483, 1420, 1176, 764, 723, 698

GC/MS: t_R = 23.73 min

m/z (% rel. Int.) = 384 [M]⁺ (15.3), 244 (8.7), 199 (100.0), 184 (6.4), 183 (6.8), 179 (6.5), 178 (9.9), 170 (2.2), 152 (1.5), 133 (0.6), 99 (0.6), 85 (3.3), 77 (1.4), 57 (10.4), 43 (14.1)

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.89	t (<i>J</i> = 6.8 Hz)	3 H	CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (10)
1.26	m	14 H	CH ₂ (3-9)
1.56	d (<i>J</i> = 7.1 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
1.62	quint (<i>J</i> = 6.8 Hz)	2 H	COO-CH ₂ -CH ₂ (2)
3.77	q (<i>J</i> = 7.1 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.11	t (<i>J</i> = 6.8 Hz)	2 H	COO-CH ₂ -CH ₂ (1)
7.13 – 7.19	m	2 H	arom.
7.36 – 7.57	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
14.14	CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (10)	123.56	arom. (5')
18.34	Ph-CH-CH ₃	127.65	arom. (4'')
22.70	CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (9)	127.80	arom. (1')
25.84	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ (3)	128.45	arom. (3'',5'')
28.55	COO-CH ₂ -CH ₂ (2)	128.96	arom. (2'',6'')
29.21	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ (4,7)	130.74	arom. (6')
29.43	CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ (5,6)	135.54	arom. (1'')
31.90	CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (8)	142.01	arom. (4')
45.13	Ph-CH-CH ₃	158.44	arom. (2')
65.17	COO-CH ₂ -CH ₂ (1)	160.90	arom. (2')
115.14	arom. (3')	174.08	COO
115.38	arom. (3')		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	78.00	8.59	-
berechnet für C ₂₅ H ₃₃ FO ₂	78.09	8.65	-

(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (32)

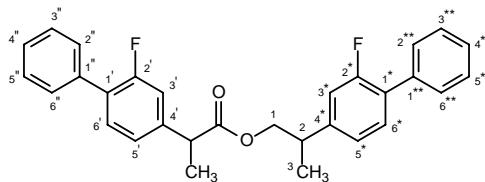
0,20 g (0,8 mmol) Flurbiprofen werden in 4 ml Toluol gelöst und mit 2 Tropfen 96%iger Schwefelsäure versetzt. Zu dieser Lösung werden 0,19 g (0,8 mmol) **4** in 10 ml Toluol unter Rühren zugetropft. Die Lösung wird 3 Stunden unter Rückfluß zum Sieden erhitzt, abkühlen gelassen, mit 20 ml Wasser verdünnt und mit 5%iger Kaliumhydroxidlösung alkalisiert. Nach der Phasentrennung trennt man die organische Phase ab und wäscht noch 2x mit je 30 ml 5%iger Kaliumhydroxidlösung sowie 2x mit je 30 ml Wasser. Trocknen der organischen Phasen über Magnesiumsulfat, Filtrieren und Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum führt zu einem Öl, welches nach 2 Tagen bei Raumtemperatur zu einem weißen Feststoff kristallisiert. Dieser kann aus n-Hexan umkristallisiert werden.

Ausbeute: 0,22 g; 59 %;

weißer Feststoff

MG: $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{F}_2\text{O}_2$ (456,53 g/mol)

Schmelzpunkt: 93°C (n-Hexan)



R_f -Wert: 0,74 (Ether)

IR (KBr, cm^{-1}): 2974, 2939, 1720, 1483, 1416, 1252, 1059, 764, 695

Hochauflösende MS:

gemessen:

456

berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{F}_2\text{O}_2$:

456,53

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.20	d ($J = 7.1$ Hz)	3 H	$\text{COO-CH}_2\text{-CH-CH}_3$
1.42	d ($J = 7.3$ Hz)	3 H	Ph-CH-CH_3
3.03	sext ($J = 7.1$ Hz)	1 H	$\text{COO-CH}_2\text{-CH-Ph}$
3.64	q ($J = 7.3$ Hz)	1 H	Ph-CH-CH_3
4.07 – 4.14	dd ($J = 10.9, 7.4$ Hz)	1 H	COO-CHH-CH-Ph
4.14 – 4.21	dd ($J = 10.9, 6.5$ Hz)	1 H	COO-CHH-CH-Ph
6.83 – 7.01	m	4 H	2x arom.
7.18 – 7.44	m	12 H	2x arom.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.77	Ph-CH-CH_3	127.62	arom. ($4'', 4''''$)
18.11	Ph-CH-CH_3	127.91	arom. ($1'$)
38.47	$\text{O-CH}_2\text{-CH-CH}_3$	128.43	arom. ($3'', 5'', 3''', 5'''$)
45.07	$\text{H}_3\text{C-CH-OOC}$	128.94	arom. ($2'', 6'', 2''', 6'''$)
69.36	$\text{O-CH}_2\text{-CH-CH}_3$	130.66	arom. ($6', 6''$)
114.69	arom. (3^*)	135.52	arom. ($1'', 1'''$)
115.07	arom. ($3', 3''$)	141.61	$\text{C-CH(CH}_3\text{)-COO}$ ($4'$)
115.46	arom. ($3'$)	144.66	$\text{O-CH}_2\text{-CH(CH}_3\text{)-C}$ (4^*)
123.30	arom. (5^*)	157.67	arom. ($2', 2''$)
123.55	arom. ($5'$)	161.62	arom. ($2', 2''$)
127.22	arom. (1^*)	173.74	COO
127.33	arom. ($1', 1''$)		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	79.20	5.53	-
berechnet für $\text{C}_{30}\text{H}_{26}\text{F}_2\text{O}_2$	78.93	5.74	-

2-[(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyloxy]-3-[(palmitoyloxy)propyl]palmitat (35)

1,00 g (1,8 mmol) 1,3-Glyceroldipalmitat werden in 10 ml Dichlormethan gelöst, unter Stickstoffbegasung 0,93 g (3,5 mmol) **27** in 6 ml Dichlormethan und 1 ml Pyridin zugegeben und die Lösung 3,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft und der Rückstand in Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wäscht man 3x mit je 20 ml 10%iger HCl-Lösung und 2x mit je 20 ml Wasser. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wird mit Ether säulenchromatographisch gereinigt.

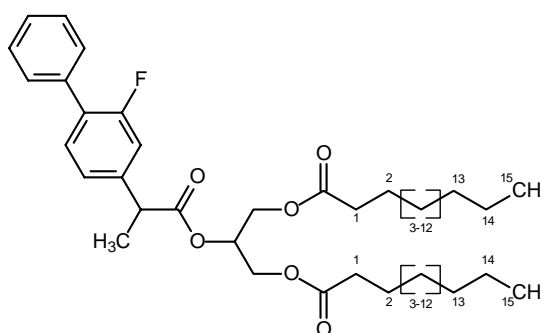
Ausbeute: 1,20 g; 43 %;

schwach gelber Feststoff

MG: C₅₀H₇₉FO₆ (795,16 g/mol)

Schmelzpunkt: 44°C

(Lit. 44 – 45°C [Svoboda, 1989])



R_f-Wert: 0,9 (Ether)

IR (KBr, cm⁻¹): 2911, 2851, 1730, 1473, 1169, 1100, 767, 698

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.89	2x t (<i>J</i> = 6.6 Hz)	6 H	2x CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (15)
1.16 – 1.35	m	48 H	2x CH ₂ (3-14)
1.55	d (<i>J</i> = 7.1 Hz) überl.	3 H	Ph-CH-CH ₃
1.48 – 1.68	m überl.	4 H	2x COO-CH ₂ -CH ₂ (2)
2.18	t (<i>J</i> = 7.6 Hz)	2 H	COO-CH ₂ -CH ₂ (1)
2.30	t (<i>J</i> = 7.5 Hz)	2 H	COO-CH ₂ -CH ₂ (1)
3.78	q (<i>J</i> = 7.1 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.06 – 4.15	dd (<i>J</i> = 11.9, 6.4 Hz)	1 H	COO-CH ₂ -CH-CHH-OOC
4.11 – 4.20	dd (<i>J</i> = 11.9, 5.9 Hz)	1 H	COO-CHH-CH-CH ₂ -OOC
4.21 – 4.30	dd (<i>J</i> = 11.9, 4.2 Hz)	1 H	COO-CH ₂ -CH-CHH-OOC
4.30 – 4.38	dd (<i>J</i> = 11.9, 4.2 Hz)	1 H	COO-CHH-CH-CH ₂ -OOC
5.28	mc	1 H	COO-CH ₂ -CH-CH ₂ -OOC
7.09 – 7.17	m	2 H	arom.
7.32 – 7.57	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
14.07	2x CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (15)	127.67	arom. (4'')

18.18	Ph-CH-CH ₃	127.77	arom. (1')
22.65	2x CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (14)	127.98	arom. (1')
24.78	2x COO-CH ₂ -CH ₂ (2)	128.41	arom. (3'',5'')
29.42	2x CH ₂ (3-12)	128.87	arom. (2'',6'')
31.89	2x CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (13)	130.71	arom. (6')
33.91	2x COO-CH ₂ -CH ₂ (1)	135.34	arom. (1'')
44.92	Ph-CH-CH ₃	141.32	arom. (4')
61.92	CO-CH ₂ -CH-CH ₂ -CO	157.65	arom. (2')
69.67	CO-CH ₂ -CH-CH ₂ -CO	161.60	arom. (2')
115.01	arom. (3')	173.01	COO
115.39	arom. (3')	173.13	COO
123.50	arom. (5')	173.22	COO

Elementaranalyse:

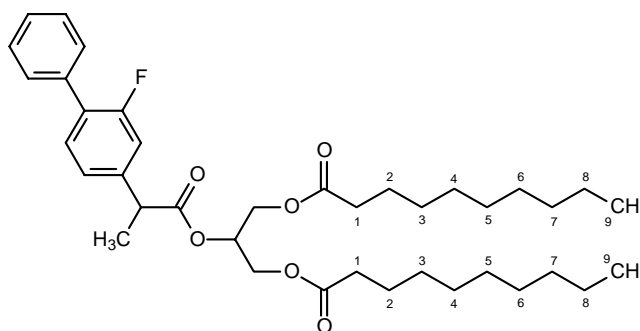
	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	75.64	10.09	-
berechnet für C ₅₀ H ₇₉ FO ₆	75.52	10.01	-

3-Decyloxy-2-[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyloxy]propyl]decanoat (36)

0,50 g (1,2 mmol) 1,3-Glyceroldidecanoat werden in 6 ml Dichlormethan gelöst, unter Stickstoffbegasung 0,69 g (2,6 mmol) **27** in 6 ml Dichlormethan und 1 ml Pyridin zugegeben und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend verdünnt man den Ansatz mit Wasser und Dichlormethan, alkalisiert mit 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung und wäscht die organische Phase 4x mit je 30 ml Natriumhydrogencarbonatlösung und 4x mit je 30 ml 10%iger HCl-Lösung. Nach Abtrennen der organischen Phase, Trocknen über Magnesiumsulfat, Filtrieren und Abdampfen des Lösungsmittels erhält man ein gelbliches Öl, welches mit Ether säulenchromatographisch gereinigt werden kann.

Ausbeute: 0,66 g; 40 %;

farbloses Öl

MG: C₃₈H₅₅FO₆ (626,85 g/mol)R_f-Wert: 0,80 (EtOH)IR (KBr, cm⁻¹): 2927, 2854, 1743, 1416, 1236, 1160, 1097, 767, 698Hochauflösende MS:

gemessen:

626

berechnet für C₃₈H₅₅FO₆:

626,85

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
0.91	t (<i>J</i> = 6.6 Hz)	6 H	2x CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (9)
1.25 – 1.29	m	24 H	2x CH ₂ (3-8)
1.56 – 1.64	d (<i>J</i> = 7.3 Hz) überl. m überl.	3 H 4 H	Ph-CH-CH ₃ 2x COO-CH ₂ -CH ₂ (2)
2.21	t (<i>J</i> = 7.5 Hz)	2 H	COO-CH ₂ -CH ₂ (1)
2.33	t (<i>J</i> = 7.5 Hz)	2 H	COO-CH ₂ -CH ₂ (1)
3.81	q (<i>J</i> = 7.3 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.09 – 4.17	dd (<i>J</i> = 11.9, 6.4 Hz)	1 H	COO-CH ₂ -CH-CH ₂ -OOC
4.15 – 4.22	dd (<i>J</i> = 12.0, 5.8 Hz)	1 H	COO-CH ₂ -CH-CH ₂ -OOC
4.25 – 4.31	dd (<i>J</i> = 11.9, 4.1 Hz)	1 H	COO-CH ₂ -CH-CH ₂ -OOC
4.33 – 4.40	dd (<i>J</i> = 12.0, 4.1 Hz)	1 H	COO-CH ₂ -CH-CH ₂ -OOC
5.32	mc	1 H	COO-CH ₂ -CH-CH ₂ -OOC
7.12 – 7.19	m	2 H	arom.
7.36 – 7.58	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
14.12	2x CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (9)	115.49	arom. (3')
18.27	Ph-CH-CH ₃	123.80	arom. (5')
22.67	2x CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (8)	127.63	arom. (4'')
24.80	2x COO-CH ₂ -CH ₂ (2)	127.76	arom. (1')
29.08	2x CH ₂ (3)	127.93	arom. (1')
29.12	2x CH ₂ (4)	128.43	arom. (3'',5'')
29.26	2x CH ₂ (5)	128.96	arom. (2'',6'')
29.42	2x CH ₂ (6)	130.78	arom. (6')
31.86	2x CH ₂ -CH ₂ -CH ₃ (7)	135.47	arom. (1'')
33.95	2x COO-CH ₂ -CH ₂ (1)	141.34	arom. (4')
44.94	Ph-CH-CH ₃	141.93	arom. (4')
61.97	CO-CH ₂ -CH-CH ₂ -CO	157.71	arom. (2')
69.67	CO-CH ₂ -CH-CH ₂ -CO	161.66	arom. (2')
115.11	arom. (3')	173.22	3x COO

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	72.96	8.96	-
berechnet für C ₃₈ H ₅₅ FO ₆	72.81	8.84	-

1-[(2*S*)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]-4-phenylpiperazin (37)

0,40 g (1,5 mmol) frisch hergestelltes **27** werden mit 1,5 g (9,2 mmol) Phenylpiperazin versetzt und 30 Minuten gerührt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend mit 50 ml Dichlormethan versetzt und 3x mit je 50 ml Natriumcarbonatlösung, 2x mit je 50 ml 10%iger HCl-Lösung und 1x mit 50 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtrieren das Lösungsmittel unter

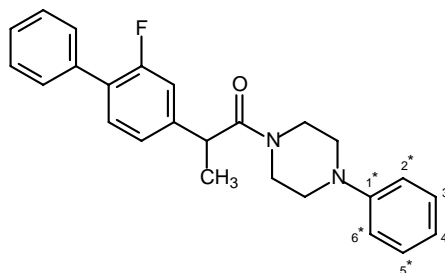
Vakuum abgedampft. Man erhält das Produkt als rosafarbenen Feststoff. Es sind nach analytischer Kontrolle keine weiteren Aufreinigungsschritte nötig.

Ausbeute: 0,51 g; 86 %; rosa Feststoff

MG: $C_{25}H_{25}FN_2O$ (388,48 g/mol)

Schmelzpunkt: 152 °C

R_f-Wert: 0,85 (EtOH)



IR (KBr, cm^{-1}): 3411, 2974, 2927, 2829, 2335, 1638, 1416, 1230, 1008, 752, 695

GC/MS: t_R = 37.49 min

m/z (% rel. Int.) = 388 $[M]^{+*}$ (19.9), 282 (1.8), 226 (2.9), 207 (5.5), 199 (11.8), 189 (10.5), 184 (5.0), 183 (8.3), 179 (4.6), 178 (10.3), 161 (15.7), 132 (100.0), 120 (43.9), 119 (32.1), 105 (18.2), 104 (17.6), 77 (16.0), 56 (33.9), 42 (5.8), 28 (21.4)

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.44	d (J = 6.8 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
2.65 - 3.25	m, überl.	4 H	2x CON-CH ₂ -CH ₂ -N
3.49 - 4.00	m, überl.	4 H	2x CON-CH ₂ -CH ₂ -N
3.89	q (J = 6.8 Hz), überl.	1 H	Ph-CH-CH ₃
6.87 - 7.06	m	5 H	arom.
7.18 - 7.48	m	8 H	arom.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
20.43	Ph-CH-CH ₃	127.83	arom. (1')
41.43	CO-N-CH ₂ -CH ₂ -N	128.45	arom. (3'',5'')
42.61	Ph-CH-CH ₃	128.90	arom. (2'',6'')
44.96	CO-N-CH ₂ -CH ₂ -N	129.44	arom. (3*,5*)
50.29	2x CO-N-CH ₂ -CH ₂ -N	131.24	arom. (6')
114.76	arom. (3')	135.26	arom. (1'')
115.14	arom. (3')	143.05	arom. (4')
117.30	arom. (2*,4*,6*)	143.17	arom. (1*)
123.18	arom. (5')	157.92	arom. (2')
127.61	arom. (1')	161.88	arom. (2')
127.73	arom. (4'')	171.50	CO

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	76.04	6.46	6.84
berechnet für $C_{25}H_{25}FN_2O \times \frac{1}{3} H_2O$	76.12	6.56	7.10

1,4-Bis[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]piperazin (39)

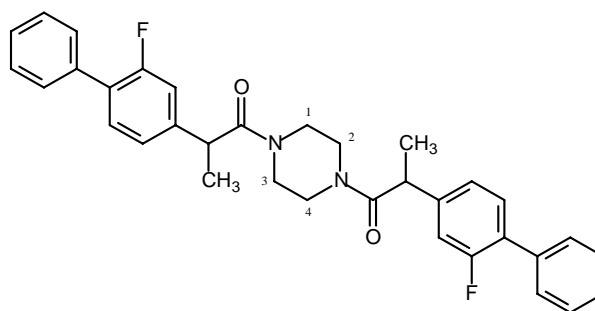
1,8 g (20,9 mmol) Piperazin werden in 10 ml Dichlormethan gelöst, tropfenweise mit einer Lösung aus 0,50 g (1,9 mmol) frisch hergestelltem **27** in 20 ml Dichlormethan versetzt und 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Reaktionsgemisch wird anschließend 4x mit je 30 ml 5%iger Natriumhydroxidlösung, 2x mit je 30 ml 10%iger HCl-Lösung und 1x mit 30 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und nach Filtrieren das Lösungsmittel unter Vakuum abgedampft. Der verbleibende weiße Feststoff kann aus Ethanol umkristallisiert werden.

Ausbeute: 0,58 g; 57 %;

weißer Feststoff

MG: $C_{34}H_{32}F_2N_2O_2$ (538,64 g/mol)

Schmelzpunkt: 149°C (EtOH)



R_f-Wert: 0,74 (EtOH)

IR (KBr, cm^{-1}): 3421, 3022, 2971, 2892, 1638, 1432, 1211, 1008, 761, 695

Hochauflösende MS:

gemessen: 539

berechnet für $C_{34}H_{32}F_2N_2O_2$: 538,64

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.46	m	6 H	2x Ph-CH-CH ₃
2.89 – 3.97	m, überl.	10 H	2x CON-CH ₂ -CH ₂ -N 2x Ph-CH-CH ₃
7.02 – 7.06	m	4 H	arom.
7.38 – 7.53	m	12 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
20.42	2x Ph-CH-CH ₃	128.45	2x arom. (3'',5'')
41.77	2x N-CH ₂ (1,4)	128.88	2x arom. (2'',6'')
42.59	2x Ph-CH-CH ₃	131.25	2x arom. (6')
45.21	2x N-CH ₂ (2,3)	135.19	2x arom. (1'')
114.66	2x arom. (3')	142.80	2x arom. (4')
115.04	2x arom. (3')	157.90	2x arom. (2')
123.06	2x arom. (5')	161.86	2x arom. (2')
127.65	2x arom. (1')	171.42	CO
127.74	2x arom. (4'')	171.76	CO
127.86	2x arom. (1')		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	75.73	6.24	5.45
berechnet für C ₃₄ H ₃₂ F ₂ N ₂ O ₂	75.82	5.99	5.20

N-[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]glycin (41)

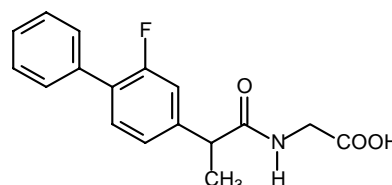
0,60 g (2,3 mmol) frisch hergestelltes **27** werden in 5 ml Dioxan gelöst und unter ständigem Rühren in eine im Eisbad auf 5-7°C gekühlte Lösung aus 0,61 g (8,1 mmol) Glycin und 0,35 g (8,8 mmol) NaOH in 7,15 ml Wasser getropft. Man läßt das Gemisch langsam auf Raumtemperatur erwärmen und 3 Stunden rühren. Anschließend wird die Lösung mit Wasser verdünnt, mit konz. HCl angesäuert und 3x mit je 60 ml Ethylacetat extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und noch 2x mit je 60 ml 10%iger HCl-Lösung und 1x mit 60 ml Wasser gewaschen. Nach der Phasentrennung nimmt man die organische Phase ab, trocknet über Magnesiumsulfat, filtriert und dampft das Lösungsmittel im Vakuum ab. Der verbleibende weiße Feststoff wird aus Hexan/Ethanol umkristallisiert.

Ausbeute: 0,55 g; 80 %; weißer, schimmernder Feststoff

MG: C₁₇H₁₆FNO₃ (301,32 g/mol)

Schmelzpunkt: 144°C (Hexan/EtOH)

R_f-Wert: 0,45 (EtOH)



IR (KBr, cm⁻¹): 3329, 2981, 2933, 1755, 1610, 1201, 764, 698

¹H-NMR (250 MHz, [D₆]-DMSO):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.38	d (<i>J</i> = 7.1 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.72, 3.80	2x d (<i>J</i> = 17.5, 5.8 Hz) überl.	3 H	NH-CHH-COOH
3.74, 3.82	2x d (<i>J</i> = 17.5, 5.8 Hz) überl.		NH-CHH-COOH
3.78	q (<i>J</i> = 7.1 Hz) überl.		Ph-CH-CH ₃
7.25 – 7.30	m	2 H	arom.
7.37 – 7.56	m	6 H	arom.
8.41	t (<i>J</i> = 5.8 Hz)	1 H	NH
12.57	s	1 H	COOH

¹H-NMR (250 MHz, MeOD):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.50	d (<i>J</i> = 7.1 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.78	q (<i>J</i> = 7.1 Hz) überl.	1 H	Ph-CH-CH ₃
3.86, 3.96	2x d (<i>J</i> = 17.7 Hz) überl.	2 H	NH-CH ₂ -COOH
7.18 – 7.26	m	2 H	arom.
7.31 – 7.51	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (MeOD):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.38	CH ₃	128.51	arom. (2'', 6'')
40.55	CH ₂ -C-CH ₂ -OH	130.37	arom. (6')
45.35	Ph-CH-CH ₃	135.53	arom. (1'')
114.52	arom. (3')	143.08	arom. (4')
114.90	arom. (3')	157.57	arom. (2')
123.45	arom. (5')	161.49	arom. (2')
127.27	arom. (4'')	171.58	CONH
127.51	arom. (1')	175.48	COOH
128.06	arom. (3'', 5'')		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	67.98	5.18	4.48
berechnet für C ₁₇ H ₁₆ FNO ₃ × 1/3 H ₂ O	67.76	5.35	4.65

(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-(2-hydroxyethyl)propanamid (42)

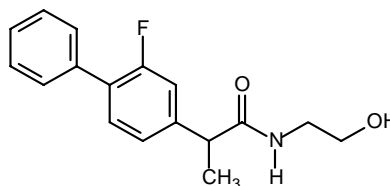
4,00 g (15,2 mmol) frisch hergestelltes **27** werden in 15 ml Ethylacetat gelöst und im Eisbad gekühlt. Zu dieser Lösung werden unter ständigem Rühren 9,30 g (152 mmol) Ethanolamin zugetropft. Der Ansatz wird langsam auf Raumtemperatur erwärmt und 3 Stunden stehengelassen. Anschließend verdünnt man mit 30 ml Wasser, trennt die Ethylacetatphase ab und wäscht noch 2x mit je 30 ml Wasser. Nach Trocknen der organischen Phase mit Magnesiumsulfat, Filtrieren und Abdampfen des Lösungsmittels

im Vakuum erhält man einen weißen Feststoff, der sich aus Hexan/Ethanol umkristallisieren lässt.

Ausbeute: 3,74 g; 85 %; weißer Feststoff

MG: $C_{17}H_{18}FNO_2$ (287,33 g/mol)

Schmelzpunkt: 95°C (Hexan/EtOH)



R_f-Wert: 0,05 (Ether)

IR (KBr, cm^{-1}): 3294, 2981, 1641, 1549, 1483, 1413, 1055, 761, 695

Hochauflösende MS:

gemessen: 288

berechnet für $C_{17}H_{18}FNO_2$: 287,33

GC/MS: t_R = 21.13 min

m/z (% rel. Int.) = 287 $[M]^+$ (14.6), 270 (0.8), 244 (2.7), 226 (1.6), 200 (100.0), 185 (52.5), 183 (18.0), 178 (20.0), 170 (8.0), 165 (4.1), 152 (4.9), 133 (1.5), 99 (2.8), 88 (37.0), 70 (24.2), 60 (2.5), 51 (2.2)

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.58	d ($J = 7.1$ Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
2.82	s	1 H	OH
3.32 – 3.44	dq ($J = 14.4, 5.5$ Hz)	1 H	HN-CHH-CH ₂ -OH
3.36 – 3.53	dq ($J = 14.4, 5.0$ Hz)	1 H	HN-CHH-CH ₂ -OH
3.63	q ($J = 7.1$ Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
3.71	t ($J = 5.0$ Hz)	2 H	HN-CH ₂ -CH ₂ -OH
6.08	s	1 H	NH
7.13 – 7.20	m	2 H	arom.
7.36 – 7.57	m	6 H	arom.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
18.60	Ph-CH-CH ₃	128.07	arom. (1')
42.61	N-CH ₂ -CH ₂ -OH	128.50	arom. (3'', 5'')
46.51	Ph-CH-CH ₃	128.92	arom. (2'', 6'')
62.24	N-CH ₂ -CH ₂ -OH	131.11	arom. (6')
115.10	arom. (3')	135.33	arom. (1'')
115.47	arom. (3')	142.53	arom. (4')
123.59	arom. (5')	157.81	arom. (2')
127.77	arom. (4'')	161.76	arom. (2')
127.86	arom. (1')	174.85	CONH

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	71.11	6.44	4.75
berechnet für C ₁₇ H ₁₈ FNO ₂	71.06	6.31	4.87

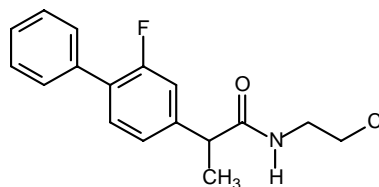
***N*-(2-chloroethyl)-(2*S*)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanamid (43)**

0,50 g (1,7 mmol) **42** werden in 8,7 ml Dichlormethan gelöst, mit 0,45 g (3,8 mmol) Thionylchlorid versetzt und 10 Minuten auf 40°C erhitzt. Nach 2 Stunden Rühren bei Raumtemperatur werden Lösungsmittel und überschüssiges Thionylchlorid im Vakuum abgedampft. Das verbleibende orange-gelbe Öl kristallisiert beim Stehen zu einem schwach gelben Feststoff, der ohne weitere Aufreinigung verwendet werden konnte.

Ausbeute: 0,53 g; 99,6 %; schwach gelber Feststoff

MG: C₁₇H₁₇ClFNO (305,78 g/mol)

Schmelzpunkt: 86°C



R_f-Wert: 0,65 (Ether)

IR (KBr, cm⁻¹): 3284, 2971, 1733, 1648, 1546, 764, 695

Hochauflösende MS:

gemessen:	306
berechnet für C ₁₇ H ₁₇ ClFNO:	305,78

GC/MS: t_R = 18.15 min

m/z (% rel. Int.) = 269 [M-HCl]⁺ (100.0), 240 (5.7), 226 (14.8), 211 (6.6), 199 (24.9), 198 (47.7), 184 (8.7), 183 (20.1), 179 (6.2), 178 (13.5), 170 (12.1), 165 (4.8), 152 (4.5), 133 (3.1), 112 (2.8), 98 (22.0), 88 (2.2), 77 (4.7), 71 (2.6), 55 (2.8), 51 (2.4)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.60	d (<i>J</i> = 7.1 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.55 – 3.69	m überl.	5 H	Ph-CH-CH ₃ HN-CH ₂ -CH ₂ -Cl
5.96	s	1 H	NH
7.14 – 7.21	m	2 H	arom.
7.37 – 7.59	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
18.50	Ph-CH-CH ₃	128.15	arom. (1')
41.36	HN-CH ₂ -CH ₂ -Cl	128.50	arom. (3'',5'')
43.87	HN-CH ₂ -CH ₂ -Cl	128.94	arom. (2'',6'')
46.57	Ph-CH-CH ₃	131.15	arom. (6')
115.13	arom. (3')	135.33	arom. (1'')
115.50	arom. (3')	142.35	arom. (4')
123.62	arom. (5')	157.84	arom. (2')
127.78	arom. (4'')	161.80	arom. (2')
127.93	arom. (1')	173.77	CONH

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	65.59	5.53	4.48
berechnet für C ₁₇ H ₁₇ ClFNO x 1/12 CH ₂ Cl ₂	65.50	5.47	4.66

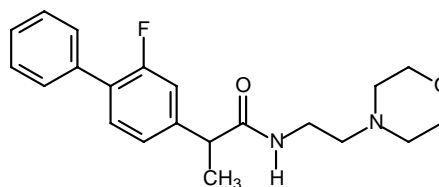
(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-[(2-morpholin-4-yl)ethyl]propanamid (44)

0,23 g (0,75 mmol) **43** werden in 4 ml Toluol gelöst, mit 0,15 ml Morpholin versetzt und unter Rückfluß erhitzt. Nach etwa 10 Minuten beginnt Morpholinhydrochlorid auszufallen. Nach 16 Stunden werden Lösungsmittel und überschüssiges Morpholin im Vakuum abgedampft und der Rückstand in 10 ml 5%iger HCl-Lösung aufgenommen. Die trübe Suspension wird 3x mit 15 ml Ether gewaschen, die Etherphasen verworfen und die wässrige Phase mit 10%iger Natriumhydroxidlösung alkalisiert. Man extrahiert 4x mit je 20 ml Ether. Nach Vereinigung der organischen Phasen, Trocknung über Magnesiumsulfat, Filtrieren und Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum erhält man ein gelbes Öl, welches mit Ethanol säulenchromatographisch gereinigt werden kann.

Ausbeute: 0,05 g; 19 %; weißer Feststoff

MG: C₂₁H₂₅FN₂O₂ (356,44 g/mol)

Schmelzpunkt: 104°C



R_f-Wert: 0, 51 (EtOH)

IR (KBr, cm⁻¹): 3278, 2952, 2848, 1644, 1546, 1416, 1119, 865, 767, 698

GC/MS: t_R = 25.15 min

m/z (% rel. Int.) = 356 [M]⁺ (0.3), 313 (0.6), 270 (0.4), 199 (3.6), 184 (1.5), 183 (2.2), 179 (1.3), 178 (2.6), 170 (0.9), 157 (0.7), 152 (0.6), 133 (0.4), 114 (1.7), 113 (20.1), 100 (100.0), 88 (1.0), 86 (0.4), 70 (2.4), 56 (5.1)

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.57	d ($J = 7.1$ Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
2.35	t ($J = 4.7$ Hz) überl.	4 H	2x N-CH ₂ -CH ₂ -O
2.42	t ($J = 6.0$ Hz) überl.	2 H	CONH-CH ₂ -CH ₂ -N
3.32	q ($J = 6.0$ Hz)	2 H	CONH-CH ₂ -CH ₂ -N
3.56 – 3.66	q ($J = 7.1$ Hz) überl.	5 H	Ph-CH-CH ₃
3.58	t ($J = 4.7$ Hz) überl.		2x N-CH ₂ -CH ₂ -O
6.02	s	1 H	NH
7.11 – 7.20	m	2 H	arom.
7.33 – 7.57	m	6 H	arom.

 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
18.25	Ph-CH-CH ₃	127.75	arom. (4'')
35.76	CONH-CH ₂ -CH ₂ -N	128.04	arom. (1')
46.64	Ph-CH-CH ₃	128.50	arom. (3'',5'')
53.13	2x N-CH ₂ -CH ₂ -O	128.84	arom. (2'',6'')
56.54	CONH-CH ₂ -CH ₂ -N	130.97	arom. (6')
66.89	2x N-CH ₂ -CH ₂ -O	135.32	arom. (1'')
115.06	arom. (3')	142.93	arom. (4')
115.52	arom. (3')	162.26	arom. (2')
123.67	arom. (5')	173.40	CONH

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	66.73	7.16	7.29
berechnet für $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{FN}_2\text{O}_2 \times \frac{5}{4} \text{H}_2\text{O}$	66.56	7.31	7.39

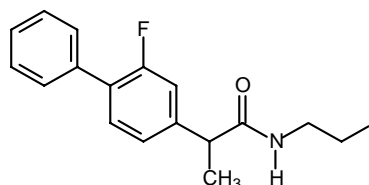
(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)-N-(2-iodoethyl)propanamid (45)

Eine Suspension aus 0,53 g (1,73 mmol) **43** und 2,60 g (17,3 mmol) trockenem Natriumiodid in 5,7 ml trockenem Aceton werden 48 Stunden unter Rühren und Rückfluß erhitzt und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Der Rückstand wird mit 60 ml Ether versetzt und der Niederschlag aus NaI und NaCl abfiltriert. Die org. Phase trocknet man über Magnesiumsulfat und dampft das Lösungsmittel nach Filtrieren im Vakuum ab. Der Rückstand kann säulenchromatographisch mit Ether gereinigt werden.

Ausbeute: 0,22 g; 31 %; oranges Öl

MG: $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{FINO}$ (397,23 g/mol)

R_f -Wert: 0,77 (Ether)



GC/MS: $t_R = 17.55$ min

m/z (% rel. Int.) = 269 [M-H]⁺ (100.0), 240 (5.8), 226 (15.6), 211 (7.2), 199 (26.9), 198 (51.0), 184 (9.8), 183 (22.1), 179 (6.9), 178 (15.2), 170 (13.5), 165 (5.4), 152 (5.3), 133 (3.6), 112 (3.2), 98 (26.2), 88 (2.5), 77 (5.9), 71 (3.2), 55 (3.6)

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.58	d ($J = 7.3$ Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.25	t ($J = 6.3$ Hz)	2 H	HN-CH ₂ -CH ₂ -I
3.54 – 3.66	q ($J = 6.3$ Hz) überl.	2 H	HN-CH ₂ -CH ₂ -I
	q ($J = 7.3$ Hz) überl.	1 H	Ph-CH-CH ₃
5.82	s	1 H	NH
7.12 – 7.20	m	2 H	arom.
7.34 – 7.56	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
5.41	N-CH ₂ -CH ₂ -I	128.20	arom. (1')
18.33	Ph-CH-CH ₃	128.46	arom. (3'',5'')
41.73	N-CH ₂ -CH ₂ -I	128.90	arom. (2'',6'')
46.60	Ph-CH-CH ₃	131.17	arom. (6')
115.18	arom. (3')	135.31	arom. (1'')
115.56	arom. (3')	142.24	arom. (4')
123.67	arom. (5')	157.86	arom. (2')
127.74	arom. (4'')	161.82	arom. (2')
127.98	arom. (1')	173.46	CONH

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	50.71	4.87	2.85
berechnet für C ₁₇ H ₁₇ FINO x ² / ₃ EtOH x ¹ / ₃ H ₂ O	50.74	5.03	3.23

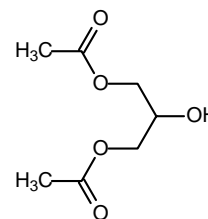
Glycerol-1,3-diacetat (83)

0,25 g (1,4 mmol) 1,3-Diacetoxyaceton (**86**) werden in 4 ml trockenem THF gelöst und 3,40 ml (3,4 mmol) 1M-BH₃*THF über 7 Stunden bei 3°C unter Rühren und Stickstoff zugetropft. Der Reaktionsverlauf wird mit GC/MS-Methode B überwacht. Nach 7 Stunden verdünnt man das Reaktionsgemisch mit Wasser und extrahiert 4x mit je 40 ml Chloroform und 1x mit 40 ml Ethylacetat. Nach Kontrolle der organischen Phasen mit GC/MS-Methode B werden die reinen Phasen vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft.

Ausbeute: 0,11 g; 45 %; farbloses Öl

MG: $C_7H_{12}O_5$ (176,17 g/mol)

IR (KBr, cm^{-1}): 3459, 2958, 1743, 1375, 1230, 1046



1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.08	s	6 H	2x CH_3
4.04 – 4.20	m, überl.	5 H	$CH_2-CH(OH)-CH_2$

^{13}C -NMR ($CDCl_3$):

δ (ppm)	Zuordnung
20.71	2x CH_3
65.17	$CH_2-CH(OH)-CH_2$
68.03	$CH-OH$
171.06	2x H_3C-COO

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	47.69	6.72	-
berechnet für $C_7H_{12}O_5$	47.73	6.87	-

1,3-Diacetoxyaceton (86)

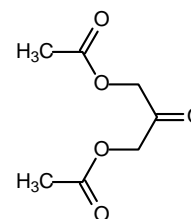
In Anlehnung an Bentley und McCrae [1970] werden 2,00 g (22,20 mmol) 1,3-Dihydroxyaceton in 7,5 ml Pyridin und 7,5 ml Acetanhydrid gelöst und 1,5 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend werden die Lösungsmittel im Vakuum weitgehend entfernt und der Rückstand in 25 ml Ethylacetat aufgenommen. Die organische Phase wird 2x mit je 30 ml Wasser, 2x mit je 30 ml 3%iger Salzsäure und weitere 2x mit je 30 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft.

Ausbeute: 0,67 g; 71 % (Lit. 81% [Bentley, 1970]);

schwach gelbliche Nadeln

MG: $C_7H_{10}O_5$ (174,15 g/mol)

Schmelzpunkt: 46°C (Lit. 46-47 °C [Bentley, 1970])



IR (KBr, cm^{-1}): 3481, 2927, 1768, 1743, 1404, 1223, 1024, 986, 843

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.16	s	6 H	2x CH ₃
4.74	s	4 H	<u>CH₂-C(O)-CH₂</u>

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung
20.31	2x CH ₃
66.25	<u>CH₂-C(O)-CH₂</u>
170.00	2x H ₃ C-COO
197.87	C=O

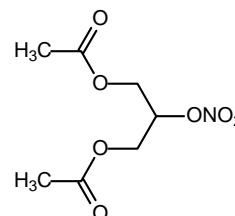
Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	48.53	5.74	-
berechnet für C ₇ H ₁₀ O ₅	48.28	5.79	-

2-(Nitrooxy)glycerol-1,3-diacetat (2-GMN-1,3-diacetat) (89)

In Anlehnung an Bentley und McCrae [1970] werden 0,50 g (2,8 mmol) Glycerol-1,3-diacetat (**83**) und 0,004 g (0,07 mmol) Harnstoff bei Raumtemperatur in 15 ml Dichlormethan gelöst und auf 3°C abgekühlt. Zu dieser Lösung tropft man unter Rühren 0,36 g (5,7 mmol) konzentrierte Salpetersäure (100%) so zu, daß die Temperatur 10°C nicht überschreitet. Anschließend wird das Reaktionsgemisch erneut auf 3°C heruntergekühlt und in gleicher Weise 0,58 g (5,7 mmol) Acetanhydrid unter Rühren zugegeben. Die Lösung wird über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mit Wasser verdünnt. Nach der Phasentrennung wird die organische Phase 1x mit 30 ml Wasser, 1x mit 30 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und weitere 2x mit je 30 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft.

Ausbeute: 0,60 g; 96 %; farbloses Öl

MG: C₇H₁₁NO₇ (221,17 g/mol)IR (KBr, cm⁻¹): 2965, 1743, 1644, 1369, 1280, 1220, 1052, 850¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
2.10	s	6 H	2x CH ₃
4.19 – 4.27	dd (J = 12.4, 6.2 Hz)	2 H	<u>CHH-CH(ONO₂)-CHH</u>

4.38 – 4.44	dd ($J = 12.4, 3.8$ Hz)	2 H	<u>C</u> HH-CH(ONO ₂)- <u>C</u> HH
5.44	mc	1 H	CH-ONO ₂

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung
20.50	2x CH ₃
60.89	<u>C</u> H ₂ -CH(ONO ₂)- <u>C</u> H ₂
77.96	<u>C</u> H-ONO ₂
170.25	2x H ₃ C- <u>C</u> OO

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	38.42	5.01	6.23
berechnet für C ₇ H ₁₁ NO ₇	38.02	5.01	6.33

3-Brom-2-(brommethyl)-2-(hydroxymethyl)propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (92)

1,00 g (4,1 mmol) Flurbiprofen werden in 2 ml trockenem THF gelöst und 0,67 g (4,1 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare Lösung wird 4 Stunden bei Raumtemperatur stengelassen, bis keine CO₂-Entwicklung mehr festzustellen ist. Zu dieser Lösung wird nun über 30 Minuten mittels Tropftrichter eine Lösung aus 1,14 g (4,4 mmol) 2,2-Bis(brommethyl)-1,3-propandiol in 2 ml trockenem THF unter Rühren langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter Feuchtigkeitsausschluß 2 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der ölige Rückstand wird in 80 ml Ether aufgenommen und die organische Phase 4x mit je 80 ml 10%iger HCl-Lösung, 1x mit 80 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 1x mit 80 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende Öl kann mit Hexan/Ethylacetat (2/1) säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,58 g; 28 %; weißer Feststoff

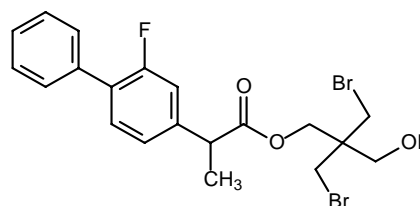
MG: C₂₀H₂₁Br₂FO₃ (488,19 g/mol)

Schmelzpunkt: 73°C

R_f-Wert: 0,54 (Hexan/ Ethylacetat 2/1)

0,72 (Hexan/ Ethylacetat 1/1)

0,78 (EtOH)



IR (KBr, cm^{-1}): 3408, 1724, 1413, 1261, 1065, 764, 695

$^1\text{H-NMR}$ (250 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.50	d ($J = 7.1$ Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
1.95	s	1 H	OH
3.25	d ($J = 10.4$ Hz) überl.	1 H	CHH-Br
3.26	s überl.	2 H	CH ₂ -Br
3.33	d ($J = 10.4$ Hz) überl.	1 H	CHH-Br
3.38	d ($J = 11.3$ Hz) überl.	1 H	CHH-OH
3.44	d ($J = 11.3$ Hz)	1 H	CHH-OH
3.74	q ($J = 7.1$ Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.06	d ($J = 11.3$ Hz)	1 H	COO-CHH
4.18	d ($J = 11.3$ Hz)	1 H	COO-CHH
7.02 – 7.10	m	2 H	arom.
7.27 – 7.48	m	6 H	arom.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.86	Ph-CH-CH ₃	128.07	arom. (1')
33.56	2x CH ₂ -Br	128.29	arom. (1')
44.28	CH ₂ -C-CH ₂ -Br	128.46	arom. (3'', 5'')
44.97	Ph-CH-CH ₃	128.92	arom. (2'', 6'')
61.71	CH ₂ -OH	130.96	arom. (6')
63.49	COO-CH ₂	135.25	arom. (1'')
114.98	arom. (3')	141.22	arom. (4')
115.36	arom. (3')	157.72	arom. (2')
123.43	arom. (5')	161.68	arom. (2')
127.77	arom. (4'')	173.85	COO

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	48.83	4.35	-
berechnet für $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{Br}_2\text{FO}_3$	49.21	4.34	-

3-Brom-2,2-bis(hydroxymethyl)propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (93)

Die Synthese erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie bei **94** beschrieben. Hier wurde nur eine andere Substanzzone mit dem entsprechenden R_f -Wert mit Hexan/Ethylacetat (2/1) säulenchromatographisch gereinigt.

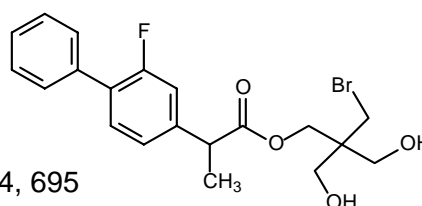
Ausbeute: 0,18 g; 18 %; beiger Feststoff

MG: $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{BrFO}_4$ (425,29 g/mol)

Schmelzpunkt: 102 °C

R_f-Wert: 0,12 (Hexan/ Ethylacetat 2/1)

IR (KBr, cm⁻¹): 3259, 2946, 1730, 1413, 1245, 1030, 764, 695



¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.57	d (<i>J</i> = 7.1 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
2.32	s	2 H	2x OH
3.30	d (<i>J</i> = 10.5 Hz)	1 H	CHH-Br
3.35	d (<i>J</i> = 10.5 Hz)	1 H	CHH-Br
3.47 – 3.59	m	4 H	2x CH ₂ -OH
3.81	q (<i>J</i> = 7.1 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.15	d (<i>J</i> = 11.5 Hz)	1 H	COO-CHH
4.25	d (<i>J</i> = 11.5 Hz)	1 H	COO-CHH
7.10 – 7.18	m	2 H	arom.
7.34 – 7.56	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.93	Ph-CH-CH ₃	128.04	arom. (1')
33.39	CH ₂ -Br	128.25	arom. (1')
44.78	CH ₂ -C-CH ₂ -Br	128.46	arom. (3'',5'')
45.02	Ph-CH-CH ₃	128.91	arom. (2'',6'')
63.13	2x CH ₂ -OH	130.95	arom. (6')
63.59	COO-CH ₂	135.24	arom. (1'')
114.98	arom. (3')	141.25	arom. (4')
115.36	arom. (3')	157.72	arom. (2')
123.44	arom. (5')	161.67	arom. (2')
127.76	arom. (4'')	174.44	COO

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	56.64	5.30	-
berechnet für C ₂₀ H ₂₂ BrFO ₄	56.48	5.21	-

2-Bromomethyl-3-hydroxy-2-[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyloxy]methyl}propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (94)

0,58 g (2,4 mmol) Flurbiprofen werden in 10 ml trockenem THF gelöst und 0,43 g (2,6 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare, schwach gelbe Lösung wird eine Stunde bei Raumtemperatur stehengelassen und anschließend in einen Tropftrichter überführt. Diese Lösung wird nun über 1,5 Stunden zu einer Lösung aus 0,78 g (3,9 mmol) 2-Bromomethyl-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol in 5 ml trockenem THF unter

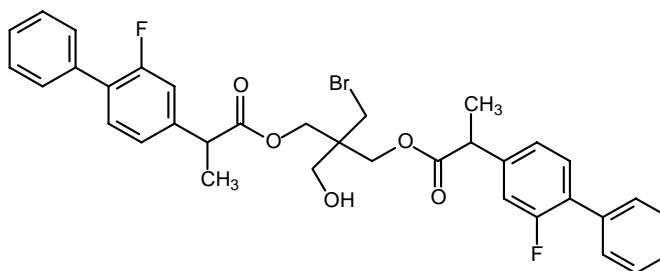
Rühren langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter Feuchtigkeitsausschluß 2 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Das verbleibende Öl wird in 50 ml Ether aufgenommen und die organische Phase 3x mit je 50 ml 10%iger HCl-Lösung, 3x mit je 50 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 2x mit je 50 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende Öl kann mit Hexan/Ethylacetat (2/1) säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,62 g; 40 %,

weißer Feststoff

MG: $C_{35}H_{33}BrF_2O_5$ (651,54 g/mol)

Schmelzpunkt: 135 °C



R_f -Wert: 0,36 (Hexan/ Ethylacetat 2/1)

IR (KBr, cm^{-1}): 3471, 2971, 2727, 1480, 1416, 1249, 1059, 764, 698

1H -NMR (250 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.46, 1.47	2x d ($J = 7.1$ Hz)	6 H	2x Ph-CH-CH ₃
2.01	s	1 H	OH
3.09	d ($J = 10.5$ Hz)	1 H	CHH-Br
3.15	d ($J = 10.5$ Hz)	1 H	CHH-Br
3.25	mc	2 H	CH ₂ -OH
3.69	q ($J = 7.1$ Hz)	2 H	2x Ph-CH-CH ₃
3.95	d ($J = 11.3$ Hz)	2 H	2x COO-CHH
4.03	d ($J = 11.3$ Hz)	2 H	2x COO-CHH
6.99 – 7.04	m	4 H	2x arom.
7.26 – 7.47	m	12 H	2x arom.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.88	2x Ph-CH-CH ₃	128.00	2x arom. (1')
32.45	CH ₂ -Br	128.20	2x arom. (1')
44.28	CH ₂ -C-CH ₂ -Br	128.44	2x arom. (3'',5'')
44.94	2x Ph-CH-CH ₃	128.93	2x arom. (2'',6'')
61.08	CH ₂ -OH	130.94	2x arom. (6')
62.84	2x COO-CH ₂	135.27	2x arom. (1'')
114.95	2x arom. (3')	141.24	2x arom. (4')
115.33	2x arom. (3')	157.70	2x arom. (2')
123.43	2x arom. (5')	161.66	2x arom. (2')
127.73	2x arom. (4'')	173.68	2x COO

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	64.64	5.44	-
berechnet für C ₃₅ H ₃₃ BrF ₂ O ₅	64.52	5.11	-

3-Brom-2,2-bis{[(2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyloxy]methyl}propyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (95)

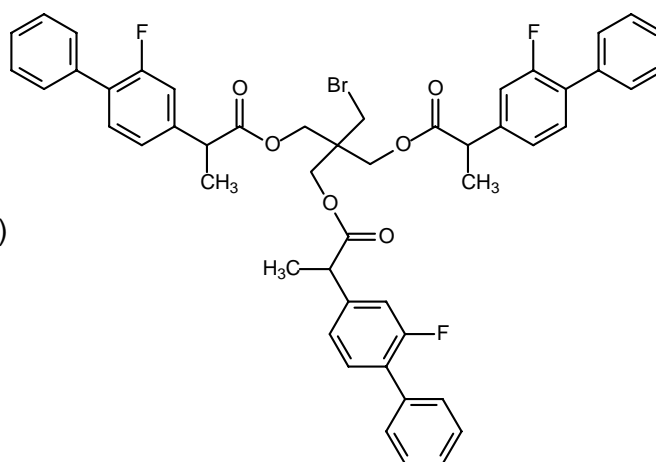
Die Synthese erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie bei **94** beschrieben. Hier wurde nur eine andere Substanzzone mit dem entsprechenden R_f-Wert mit Hexan/Ethylacetat (2/1) säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute: 0,30 g; 14%;

farbloses Harz

MG: C₅₀H₄₄BrF₃O₆ (877,79 g/mol)

R_f-Wert: 0,65 (Hexan/ Ethylacetat 2/1)



IR (KBr, cm⁻¹): 3440, 2924, 2854, 1743, 1625, 1483, 1416, 1169, 1065, 767, 695

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.50	d (<i>J</i> = 7.1 Hz)	9 H	3x Ph-CH-CH ₃
3.04	d (<i>J</i> = 10.7 Hz)	1 H	CHH-Br
3.12	d (<i>J</i> = 10.7 Hz)	1 H	CHH-Br
3.71	q (<i>J</i> = 7.1 Hz)	3 H	3x Ph-CH-CH ₃
3.91	d (<i>J</i> = 11.3 Hz)	3 H	3x COO-CHH
3.96	d (<i>J</i> = 11.3 Hz)	3 H	3x COO-CHH
7.04	m	6 H	3x arom.
7.32 – 7.54	m	18 H	3x arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.79	3x Ph-CH-CH ₃	128.19	3x arom. (1')
31.73	CH ₂ -Br	128.42	3x arom. (3'',5'')
42.67	CH ₂ -C-CH ₂ -Br	128.94	3x arom. (2'',6'')
44.84	3x Ph-CH-CH ₃	130.95	3x arom. (6')
62.52	3x COO-CH ₂	135.31	3x arom. (1'')

114.91	3x arom. (3')	141.17	3x arom. (4')
115.29	3x arom. (3')	157.69	3x arom. (2')
123.40	3x arom. (5')	161.65	3x arom. (2')
127.70	3x arom. (4'')	172.83	3x COO
127.97	3x arom. (1')		

Elementaranalyse:

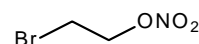
	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	68.48	5.27	-
berechnet für C ₅₀ H ₄₄ BrF ₃ O ₆	68.42	5.05	-

2-Bromethylnitrat (109)

0,84 g (12 mmol) 90%ige Salpetersäure werden nach Jain *et al.* [2004] tropfenweise unter ständigem Rühren zu 1,30 g eisgekühlter konzentrierter Schwefelsäure gegeben und eine Stunde gerührt. Zu dieser Lösung werden anschließend 1,00 g (8,0 mmol) 2-Bromethanol unter Rühren und Eiskühlung bei 0°C zugetropft. Nach 3 Stunden gießt man das Reaktionsgemisch in Eiswasser und extrahiert 2x mit Ether. Die organischen Phasen werden vereinigt und 3x mit je 60 ml gesättigter Natriumhydrogencarbonatlösung und 2x mit je 60 ml Wasser gewaschen. Die Etherphase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft.

Ausbeute: 0,74 g; 54 % (Lit. 76% [Jain, 2004]); oranges Öl

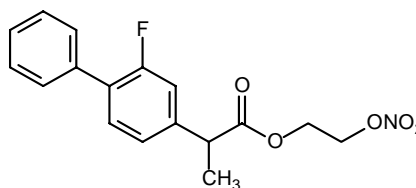
MG: C₂H₄BrNO₃ (169,96 g/mol)

**2-(Nitrooxy)ethyl (2S)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoat (110)**

0,74 g (4,4 mmol) 2-Bromethylnitrat (**109**), 0,61 g (4,4 mmol) wasserfreies Kaliumcarbonat und 1,07 g (4,4 mmol) Flurbiprofen werden nach Jain *et al.* [2004] in 13 ml trockenem DMF gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Anschließend wird der Ansatz 8x mit je 15 ml n-Hexan extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und 2x mit je 100 ml 5%iger Natriumhydrogencarbonatlösung gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel im Vakuum abgedampft. Das verbleibende Öl kann mit Ether oder Toluol säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,95 g; 65 %; oranges Öl

MG: C₁₇H₁₆FNO₅ (333,32 g/mol)



R_f-Wert: 0,36 (Toluol)

0,85 (Ether)

0,88 (EtOH)

IR (KBr, cm^{-1}): 3031, 2981, 1739, 1638, 1280, 1173, 856, 767, 698

Hochauflösende MS: gemessen: 333
berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{FNO}_5$: 333,32

$^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.59	d ($J = 7.1$ Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.83	q ($J = 7.1$ Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.34 – 4.50	mc	2 H	CO-CH ₂ -CH ₂ -ONO ₂
4.61 – 4.75	m	2 H	CO-CH ₂ -CH ₂ -ONO ₂
7.13 – 7.20	m	2 H	arom.
7.37 – 7.60	m	6 H	arom.

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
18.23	Ph-CH-CH ₃	128.19	arom. (1')
44.77	Ph-CH-CH ₃	128.47	arom. (3'',5'')
60.70	COO-CH ₂	128.95	arom. (2'',6'')
70.20	CH ₂ -ONO ₂	130.94	arom. (6')
115.03	arom. (3')	135.40	arom. (1'')
115.41	arom. (3')	141.11	arom. (4')
123.52	arom. (5')	157.73	arom. (2')
127.73	arom. (4'')	161.68	arom. (2')
127.97	arom. (1')	173.64	COO

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	62.71	4.91	3.67
berechnet für $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{FNO}_5 \times \frac{1}{5}$ Toluol	62.83	5.04	3.98

3-(Nitrooxy)-2,2-bis[(nitrooxy)methyl]propyl *N*-[(2*S*)-2-(2-fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]glycinat (111)

0,05 g (0,17 mmol) **41** werden in 2 ml trockenem THF gelöst und 0,03 g (0,19 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare Lösung wird 3 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen bis keine CO_2 -Entwicklung mehr festzustellen ist. Zu dieser Lösung wird nun über 1,5 Stunden mittels Tropftrichter eine Lösung aus 0,05 g (0,18 mmol) PETriN (**6**) in 2 ml trockenem THF unter Rühren langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter Feuchtigkeitsausschluß 4 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der ölige Rückstand wird in 40 ml Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase 3x mit je 40 ml 10%iger HCl-Lösung und 1x mit 40 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt,

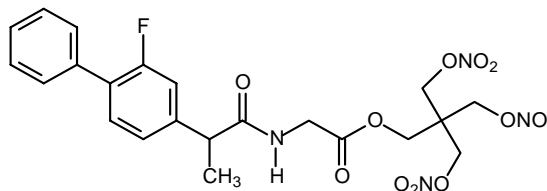
über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Der verbleibende weiß-gelbe Feststoff kann mit Ether säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,03 g; 33 %; grünliches Harz

MG: $C_{22}H_{23}FN_4O_{12}$ (554.44 g/mol)

R_f-Wert: 0,87 (EtOH)

0,53 (Ether)



IR (KBr, cm^{-1}): 3440, 3316, 2974, 2917, 1761, 1667, 1642, 1515, 1274, 1173, 995, 843

1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.58	d ($J = 7.1$ Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.67	q ($J = 7.1$ Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
3.96 – 4.02	dd ($J = 18.0, 5.6$ Hz)	1 H	COO-CH ₂ -C
4.03 – 4.09	dd ($J = 18.0, 5.6$ Hz)	1 H	COO-CH ₂ -C
4.30	s	2 H	HN-CH ₂ -COO
4.55	s	6 H	3x CH ₂ -ONO ₂
5.97	t ($J = 5.6$ Hz)	1 H	NH
7.13 – 7.20	m	2 H	arom.
7.37 – 7.57	m	6 H	arom.

^{13}C -NMR ($CDCl_3$):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
18.36	Ph-CH-CH ₃	128.31	arom. (1')
41.53	HN-CH ₂ -COO	128.50	arom. (3', 5')
42.32	CH ₂ -C-CH ₂ -ONO ₂	128.90	arom. (2', 6')
46.26	Ph-CH-CH ₃	131.21	arom. (6')
62.11	COO-CH ₂ -C-CH ₂	135.23	arom. (1'')
69.08	3x CH ₂ -ONO ₂	141.95	arom. (4')
115.27	arom. (3')	158.63	arom. (2')
115.50	arom. (3')	161.10	arom. (2')
123.67	arom. (5')	169.02	COO
127.81	arom. (4'')	174.09	CONH
128.18	arom. (1')		

Elementaranalyse:

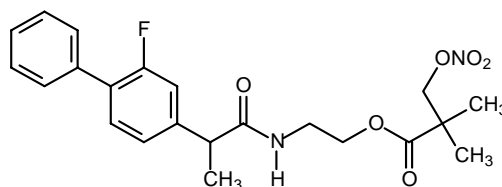
	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	48.72	4.20	9.40
berechnet für $C_{22}H_{23}FN_4O_{12} \times \frac{1}{3}$ Ether	48.39	4.58	9.67

2-[[2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propanoyl]amino}ethyl 2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)propanoat (113)

0,15 g (1,01 mmol) Nitratopivalinsäure werden in 5,5 ml trockenem THF gelöst und 0,16 g (1,01 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare Lösung wird 3 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen, bis keine CO₂-Entwicklung mehr festzustellen ist. Zu dieser Lösung wird nun über eine Stunde mittels Tropftrichter eine Lösung aus 0,29 g (1,01 mmol) **42** in 2 ml trockenem THF unter Rühren langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter Feuchtigkeitsausschluß über Nacht bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der ölige Rückstand wird in 40 ml Ether aufgenommen und die organische Phase 3x mit je 40 ml 10%iger HCl-Lösung und 1x mit 40 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende Öl kann mit Ether säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,21 g; 48 %; schwach blaues Öl

MG: C₂₂H₂₅FN₂O₆ (432,45 g/mol)



R_f-Wert: 0,47 (Ether)

IR (KBr, cm⁻¹): 3303, 2984, 2936, 1739, 1635, 1540, 1280, 1217, 1157, 872, 767, 698

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.20	s	3 H	H ₃ C-C-CH ₃
1.21	s	3 H	H ₃ C-C-CH ₃
1.56	d (J = 7.1 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.50	t (J = 4.8 Hz), überl.	1 H	HN-CHH-CH ₂ -COO
3.52	t (J = 5.7 Hz), überl.	1 H	HN-CHH-CH ₂ -COO
3.59	q (J = 7.1 Hz) überl.	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.20	t (J = 4.8 Hz)	2 H	HN-CH ₂ -CH ₂ -COO
4.42	d (J = 10.5 Hz)	1 H	CHH-ONO ₂
4.46	d (J = 10.5 Hz)	1 H	CHH-ONO ₂
5.72	s	1 H	NH
7.11 – 7.17	m	2 H	arom.
7.34 – 7.55	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
18.35	Ph-CH-CH ₃	127.89	arom. (1')
22.22	H ₃ C-C-CH ₃	128.10	arom. (1')
38.93	HN-CH ₂ -CH ₂ -COO	128.46	arom. (3'',5'')
42.19	H ₃ C-C-CH ₃	128.84	arom. (2'',6'')

46.54	Ph- <u>CH</u> -CH ₃	131.09	arom. (6')
63.74	HN-CH ₂ -CH ₂ -COO	135.26	arom. (1'')
77.55	<u>CH</u> ₂ -ONO ₂	142.49	arom. (4')
115.07	arom. (3')	157.82	arom. (2')
115.45	arom. (3')	161.78	arom. (2')
123.61	arom. (5')	173.68	COO
127.74	arom. (4'')	174.36	CONH

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	61.02	5.53	6.29
berechnet für C ₂₂ H ₂₅ FN ₂ O ₆	61.10	5.83	6.48

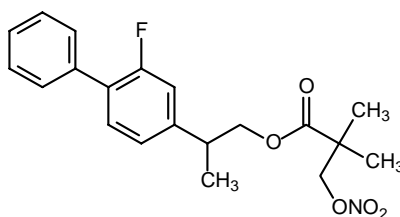
(2S)-2-(2-Fluor-1,1'-biphenyl-4-yl)propyl 2,2-dimethyl-3-(nitrooxy)propanoat (114)

0,15 g (1,01 mmol) Nitratopivalinsäure werden in 5 ml trockenem THF gelöst und 0,16 g (1,01 mmol) 1,1'-Carbodiimidazol (CDI) zugegeben. Die klare Lösung wird 3 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen, bis keine CO₂-Entwicklung mehr festzustellen ist. Zu dieser Lösung wird nun über 1,5 Stunden mittels Tropftrichter eine Lösung aus 0,23 g (1,00 mmol) **4** in 2 ml trockenem THF unter Rühren langsam zugetropft. Die klare Lösung läßt man unter Feuchtigkeitsausschluß 11 Tage bei Raumtemperatur stehen und dampft anschließend im Vakuum ab. Der ölige Rückstand wird in 20 ml Dichlormethan aufgenommen und die organische Phase 6x mit je 20 ml 10%iger HCl-Lösung und 1x mit 20 ml Wasser gewaschen. Die organische Phase wird abgetrennt, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel nach Filtration unter Vakuum abgedampft. Das verbleibende Öl kann mit Ether säulenchromatographisch gereinigt werden.

Ausbeute: 0,18 g; 48 %; oranges Öl

MG: C₂₀H₂₂FN₂O₅ (375,40 g/mol)

R_f-Wert: 0,72 (Ether)



IR (KBr, cm⁻¹): 2974, 1739, 1635, 1283, 1157, 979, 869, 767, 698

¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃):

δ (ppm)	Multiplizität	Integration	Zuordnung
1.23	s	6 H	H ₃ C-C-CH ₃
1.35	d (J = 7.1 Hz)	3 H	Ph-CH-CH ₃
3.17	sext (J = 7.1 Hz)	1 H	Ph-CH-CH ₃
4.20, 4.25	2x d (J = 10.9 Hz)	1 H	Ph-CH-CHH-O
4.23, 4.28	2x d (J = 10.9 Hz)	1 H	Ph-CH-CHH-O
4.43	s	2 H	CH ₂ -ONO ₂

7.00 – 7.09	m	2 H	arom.
7.33 – 7.57	m	6 H	arom.

¹³C-NMR (CDCl₃):

δ (ppm)	Zuordnung	δ (ppm)	Zuordnung
17.72	Ph-CH- <u>C</u> H ₃	127.58	arom. (4'')
22.27	H ₃ <u>C</u> -C-CH ₃	128.41	arom. (3'',5'')
38.47	Ph- <u>C</u> H-CH ₃	128.92	arom. (2'',6'')
42.10	H ₃ C-C- <u>C</u> H ₃	130.67	arom. (6'')
69.54	Ph-CH- <u>C</u> H ₂ -O	135.57	arom. (1'')
77.55	<u>C</u> H ₂ -ONO ₂	144.47	arom. (4')
114.62	arom. (3')	157.74	arom. (2')
114.99	arom. (3')	161.68	arom. (2')
123.21	arom. (5')	174.18	COO
127.29	arom. (1')		

Elementaranalyse:

	C (%)	H (%)	N (%)
gemessen	61.26	5.82	3.96
berechnet für C ₂₀ H ₂₂ FNO ₅ x ⁴ / ₅ H ₂ O	61.63	6.10	3.59

Aβ	β-Amyloid
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ACh	Acetylcholin
AChE	Acetylcholinesterase
ACN	Acetonitril
AD	Alzheimer'sche Erkrankung, Alzheimer Demenz, Alzheimer's Disease (engl.)
ADAM	a disintegrin and metalloprotease
ADAS-cog.	Alzheimer's Disease Assessment Scale – cognitive subscale
AgBr	Silberbromid
AgCl	Silberchlorid
AgHal	Silberhalogenid
AgNO ₃	Silbernitrat
AICD	APP intracellular domain
ALDH	Aldehyddehydrogenase
Aph-1	anterior pharynx defective-1
ApoE	Apolipoprotein E
apoER	apolipoprotein E receptor
APP	amyloid precursor protein (Amyloid-Vorläufer-Protein)
arom.	aromatisch
Asp	Asparaginsäure
Asp-2	aspartic protease 2
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BACE	β-site APP-cleaving enzyme
BH ₃	Boran
BrdU	Bromdesoxyuracil
BSA	bovine serum albumin
BuChE	Butyrylcholinesterase
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
Ca	Calcium
ca.	circa
CdCl ₂	Cadmiumchlorid
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
CDI	1,1'-Carbodiimidazol
cdk	cyclin dependent kinase
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CHCl ₃	Chloroform
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CH ₃ COONa	Natriumacetat
CHO	chinese hamster ovary
CH ₃ OH	Methanol
C ₂ H ₅ OH	Ethanol
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
COSY	Correlated Spectroscopy
COX	Cyclooxygenase
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit
CTF	C-terminales Fragment
CYP	Cytochrom
d	Dublett
DC	Dünnschichtchromatographie
DCC	N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid

DCU	N,N'-Dicyclohexylharnstoff
DDQ	2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DEPT	Distortionless Enhancement of NMR signals by Polarization Transfer
dd	Dublett vom Dublett bzw. Doppeldublett
d.h.	das heißt
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
[D ₆]-DMSO	deutერიertes DMSO
DNS	Desoxyribonukleinsäure
D ₂ O	deutერიertes H ₂ O
dq	Dublett vom Quartett
dt	Dublett vom Triplett
d.Th.	der Theorie
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-hydrochlorid
EI	Elektronenstoß-Ionisationsdetektor
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
engl.	englisch
eNOS	endotheliale NO-Synthase
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ErbB	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
Etac	Ethylacetat
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
<i>et al.</i>	et alii (und andere)
FAD	familiar Alzheimer's disease
FKS	Fetales Kälberserum
FPP	Farnesylpyrophosphat
g	Gramm
GC	Gaschromatographie
GC/MS	GC, gekoppelt mit Massenspektrometer
GDN	Glyceroldinitrat
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GI	gastrointestinal
GMN	Glycerolmononitrat
GSK	glycogen synthase kinase
GTN	Glyceroltrinitrat
h	Stunde
H	Wasserstoff
Hal	Halogen
HCl	Salzsäure
HEK	human embryonic kidney
HETE	Hydroxyeicosatetraensäure
12-HHT	12-Hydroxy-5,8,10-heptatriensäure
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HNO ₃	Salpetersäure
H ₂ N-NH ₂	Hydrazin
H ₂ O	Wasser
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol

HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
Hz	Hertz
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
ICD	intracellular domain
-I-Effekt	negativer induktiver Effekt
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
in situ	„an Ort und Stelle“ (lat.)
InsP ₃	Inositoltriphosphat
InsP ₃ R	InsP ₃ -Rezeptor
IR	Infrarot
INT	2-(4-Iodphenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2 <i>H</i> -tetrazol-3-iumchlorid
<i>J</i>	Kopplungskonstante
² <i>J</i>	geminale Kopplungskonstante
³ <i>J</i>	vicinale Kopplungskonstante
KBr	Kaliumbromid
K ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
Kap.	Kapitel
k.H.	keine Hemmung
KI	Kaliumiodid
KOH	Kaliumhydroxid
konz.	konzentriert
Konz.	Konzentration
l	Liter
lat.	lateinisch
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	low-density lipoprotein
LiAlH ₄	Lithiumaluminiumhydrid
Lit.	Literatur
LOX	Lipoxygenase
Lsg.	Lösung
LM	Lösungsmittel
LP	Lipidperoxidation
LPS	Lipopolysaccharid
LTB ₄	Leukotrien B ₄
Lys	Lysin
µm	Mikrometer
µM	mikromolar
m	Multipllett
M	Molpeak bzw. Molarität
mAChR	muscarinerger Acetylcholin-Rezeptor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MARK	microtubule affinity regulation kinase
mc	zentriertes Multipllett
MEM	Minimum Essential Medium
MeOD	deuteriertes Methanol
MeOH	Methanol
Met	Methionin
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
MgBr ₂	Magnesiumbromid
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHz	Megahertz
min	Minute(n)

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MMSE	Mini Mental Status Examination
MMST	Mini Mental Status Test
mol	Mol
MP	mitochondrial permeability transition pores / megapores
mRNS	„messenger“ Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
m/z	Masse/Ladung
N	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NaBr	Natriumbromid
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (reduzierte Form)
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierte Form)
NaI	Natriumiodid
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bestimmt
NCT	Nicastrin
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NFT	neurofibrillar tangles
NH-	Amid-
NICD	NOTCH intracellular domain
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
NTF	N-terminales Fragment
O ₂	elementarer Sauerstoff
O ₂ ⁻	Superoxid-Anion
OH-	Hydroxyl-
ONOO ⁻	Peroxynitrit
PAS	peripheric anionic side
PD	Privatdozent
PE	Pentaerythritol
PEDiN	Pentaerythritoldinitrat
PEMN	Pentaerythritolmononitrat
PEN-2	presenilin enhancer-2
PETN	Pentaerythritoltetranitrat
PETriN	Pentaerythritoltrinitrat
PG	Prostaglandin
PGB ₁	Prostaglandin B ₁
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGHS	Prostaglandin-G/H-Synthase

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
PHF	paired helical filaments
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PKA	cAMP-dependent protein kinase
PKC	Proteinkinase C
PP	Phosphatase
ppm	parts per million
PS	Presenilin
q	Quartett
quint	Quintett
R-COOH	Carbonsäure
rel. Int.	relative Intensität
R _f	Retentionsfaktor
RF	Rückfluß
R-Hal	Alkylhalogenid
R-OH	Alkohol
RNiS	reaktive Stickstoffspezies
R-ONO ₂	Alkylnitrat
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RP	Umkehrphase
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodin-Rezeptor
σ	Chemische Verschiebung
s	Singulett
s.	siehe
sAPP	"lösliches" (soluble) APP-Fragment
SC	Säulenchromatographie
sext	Sextett
sGC	lösliche Guanylatzyklase
S _N	nucleophile Substitution
SNAP	S-Nitroso-N-acetyl-penicillamin
s.o.	siehe oben
SO ₂	Schwefeldioxid
sog.	sogenannt
s.v.	siehe vorn
t	Triplett
t _R	Retentionszeit
Tab.	Tabelle
THF	Tetrahydrofuran
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TZD	Thiazolidindione
U	Unit
u.a.	unter anderem
überl.	überlagert
u.U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
V	Volumen
Vgl.	Vergleich
VLDLR	very low-density lipoprotein receptor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil

- Abouzid K., Froberg P., Lehmann J., Decker M.: 6-Aryl-4-oxohexanoic acids: synthesis, effects on eicosanoid biosynthesis, and anti-inflammatory in vivo-activities; *Med Chem*, 2007, 3, 433 - 8
- Adams S. S., Armitage B. J., Nicholson J. S., Blancafort A. R.: Therapeutically active phenylalkane derivatives; *Offenlegungsschrift US 4053639*, 1977
- Aisen P. S., Schafer K. A., Frundman M., Pfeiffer E., Sano M., *et al.*: Effects of rofecoxib or naproxen vs. placebo on Alzheimer disease progression. A randomized controlled trial; *J Am Med Assoc*, 2003, 289, 2819 - 26
- Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., *et al.*: Inflammation and Alzheimer's disease; *Neurobiol Aging*, 2000, 21, 383 - 421
- Alegret M., Silvestre J. S.: Pleiotropic effects of statins and related pharmacological experimental approaches; *Methods Find Exp Clin Pharmacology*, 2006, 28, 627 - 56
- Allegretti M., Bertini R., Cesta M. C., Bizzarri C., Bitondo R., *et al.*: 2-Arylpropionic CXC chemokine receptor 1 (CXCR1) ligands as novel noncompetitive CXCL8 inhibitors; *J Med Chem*, 2005, 48, 4312 - 31
- al-Swayeh O. A., Clifford R. H., del Soldato P., Moore P. K.: A comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of nitroaspirin and aspirin; *Brit J Pharmacol*, 2000, 129, 343 - 50
- al-Swayeh O. A., Futter L. E., Clifford R. H., Moore P. K.: Nitroparacetamol exhibits anti-inflammatory and anti-nociceptive activity; *Brit J Pharmacol*, 2000, 130, 1453 - 6
- Ancelin M.-L., Christen Y., Ritchie K.: Is antioxidant therapy a viable alternative for mild cognitive impairment? Examination of the evidence; *Dement Geriatr Cogn Disord*, 2007, 24, 1 - 19
- Andersson J., Belli A., Cannata V., Hedberg M., *et al.*: Manufacturing process for NO-donating compounds such as NO-donating Diclofenac; *Offenlegungsschrift WO 2004026808*, 2004
- Arbel M., Solomon B.: A novel immunotherapy for Alzheimer's disease: antibodies against the beta-secretase cleavage site of APP; *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4, 437 - 45
- Arena B.: Nitric esters having a pharmacological activity and process for their preparation; *Offenlegungsschrift WO9412463*, 1994
- Arispe N., Doh M.: Plasma membrane cholesterol controls the cytotoxicity of Alzheimer's disease AbetaP (1-40) and (1-42) peptides; *FASEB*, 2002, 16, 1526 - 36
- Arispe N., Rojas E., Pollard H. B.: Alzheimer disease amyloid beta protein forms calcium channels in bilayer membranes: blockade by tromethamine and aluminum; *Proc Nat Acad Sci USA*, 1993 a, 90, 567 - 71
- Arispe N., Pollard H. B., Rojas E.: Giant multilevel cation channels formed by Alzheimer disease amyloid beta-protein [A beta P-(1-40)] in bilayer membranes; *Proc Nat Acad Sci USA*, 1993 b, 90, 10573 - 7
- Arriagada P. V., Growdon J. H., Hedley-Whyte E. T., Hyman B. T.: Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease; *Neurology*, 1992, 42(3 Pt 1), 631 - 9
- Ashton P., Crooks P. A., Riggs R. M., Cynkowski T., Cynkowska G.: Codrugs as a method of controlled drug delivery; *Offenlegungsschrift WO 9520567*, 1995
- Aslan M., Ozben T.: Reactive oxygen and nitrogen species in Alzheimer's disease; *Curr Alzheimer Res*, 2004, 1, 111 - 9
- Austen B., Christodoulou G., Terry J. E. : Relation between cholesterol levels, statins and Alzheimer's disease in the human population; *J Nutr Health Aging*, 2002, 6, 377 - 82
- Avila J., Perez M., Lucas J. J., Gomez-Ramos A., Maria I. S., *et al.*: Assembly in vitro of tau protein and its implications in Alzheimer's disease; *Curr Alzheimer Res*, 2004, 1, 97 - 101
- Avramovich Y., Amit T., Youdim M.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs stimulate secretion of non-amyloidogenic precursor protein; *J Biol Chem*, 2002, 277, 31466 - 73
- Bachurin S. O.: Medicinal chemistry approaches for the treatment and prevention of Alzheimer's disease; *Med Res Rev*, 2003, 23, 48 - 88

- Baker J. W., Easty D. M.: Hydrolytic decomposition of esters of nitric acid. Part I. General experimental techniques. Alkaline hydrolysis and neutral solvolysis of methyl, ethyl, isopropyl, and *tert*-butyl nitrates in aqueous alcohol; *J Chem Soc*, 1952, 1193-1207
- Baker J. W., Easty D. M.: Hydrolysis of organic nitrates; *Nature*, 1950, 166, 156
- Ballatore C., Lee V. M.-Y., Trojanowski J. Q.: Tau-mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease and related disorders; *Nat Rev Neurosci*, 2007, 8, 663 – 72
- Bamberger M. E., Landreth G. E.: Microglial interaction with beta-amyloid: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease; *Microsc Res Tech*, 2001, 54, 59 - 70
- Bandarage U. K., Janero D. R.: Nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drugs: novel gastrointestinal-sparing drugs; *Mini Rev Med Chem*, 2001, 1, 57 - 70
- Barger S. W., Fiscus R. R., Ruth P., Hofmann F., Mattson M. P.: Role of cyclic GMP in the regulation of neuronal calcium and survival by secreted forms of β -amyloid precursor; *J Neurochem*, 1995, 64, 2087 - 96
- Basak A., Nag A., Bhattacharya G., Mandal S., Nag S. : Chemoenzymatic synthesis of anti-inflammatory drugs in enantiomerically pure form; *Tetrahedron: Asymmetry*, 2000, 11, 2403 – 7
- Behr D., Graham S. L.: Protease inhibitors as potential disease-modifying therapeutics for Alzheimer's disease; *Exp Opin Invest Drugs*, 2005, 14, 1385 - 1409
- Behr D., Clarke E. E., Wrigley J. D. J., *et al.*: Selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and their derivatives target γ -Secretase at a novel site: evidence for an allosteric mechanism; *J Biol Chem*, 2004, 279, 43419 - 26
- Belli A., Cannata V., Fonduca T., Hedberg M., Westermark A., Villa M.: New process; *Offenlegungsschrift WO 03045896*, 2003
- Benedini F., Oldani E., Castaldi G., Tarquini A.: Process for the preparation of naproxene nitroxyalkylesters; *Offenlegungsschrift WO 0110814*, 2001
- Bentley P., McCrae W.: An efficient synthesis of symmetrical 1,3-diglycerides; *J Org Chem*, 1970, 35, 2082 - 3
- Bernardo A., Minghetti L.: Regulation of Glial Cell Functions by PPAR-gamma Natural and Synthetic Agonists; *PPAR Res*, 2008, 2008, 864140
- Bernardo A., Gasparini L., Ongini E., Minghetti L.: Dynamic regulation of microglial functions by the non-steroidal anti-inflammatory drug NCX 2216: implications for chronic treatments of neurodegenerative diseases; *Neurobiol Dis*, 2006 a, 22, 25 - 32
- Bernardo A., Minghetti L.: PPAR-gamma agonists as regulators of microglial activation and brain inflammation; *Curr Pharm Des*, 2006 b, 12, 93 - 109
- Bernardo A., Ajmone-Cat Maria A., Gasparini L., Ongini E., Minghetti L.: Nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor- γ is activated in rat microglial cells by the anti-inflammatory drug HCT1026, a derivative of flurbiprofen; *J Neurochem*, 2005, 92, 895 - 903
- Berridge M. J., Bootman M. D., Lipp P.: Calcium - a life and death signal; *Nat*, 1998, 395, 645 - 8
- Berthmann A., Ratz H., : Allgemeine Gesichtspunkte bei der Herstellung von Salpetrig- und Salpetersäureester; In *Houben-Weyl – Methoden der Organischen Chemie*; Bayer E., Berthmann A., Hausweiler A., Hrsg.; Thieme: Stuttgart, 1963, 6, 329 – 62
- Bhandarkar S.V., Neau S. H.: Lipase-catalyzed enantioselective esterification of flurbiprofen with n-butanol; *Electronic J Biotech*, 2000, 3, 195 - 201
- Bhuniya S., Seo Y. J., Kim B. H.: (S)-(+)-Ibuprofen-based hydrogelators: an approach toward anti-inflammatory drug delivery; *Tetrahedron Letters*, 2006, 47, 7153 - 6
- Bianca V. D., Dusi S., Bianchini E., Dal Pra I., Rossi F.: Beta-amyloid activates the O-2 forming NADPH oxidase in microglia, monocytes, and neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease; *J Biol Chem*, 1999, 274, 15493 - 9
- Bird T. D.: Genetic factors in Alzheimer's disease; *N Engl J Med*, 2005, 352, 862 – 4

- Bograchov E.: Exchange reactions between aldehydeacetals and aldehyds.I.; *J Am Chem Soc*; 1950, 72, 2268 – 70
- Blurton-Jones M., Laferla F. M.: Pathways by which Abeta facilitates tau pathology; *Curr Alzheimer Res*, 2006, 3, 437 - 48
- Boothby L. A., Doering P. L.: Vitamin C and vitamin E for Alzheimer 's disease; *Ann Pharmacother*, 2005, 39, 2073 - 80
- Boschan R.: The reaction of alkyl chloroformates with silver nitrate. evidence for stereoselective intramolecular formation of nitrate esters; *J Am Chem Soc*, 1959, 81, 3341 – 6
- Boschan R., Merrow R. T., Van Dolah R. W.: The Chemistry of Nitrate Esters; *Chem Rev*, 1955, 55, 485 – 510
- Brandstaetter-Kuhnert M., Kuhnert G.: Table for identification of medicinals on the Kofler hotblock; *Scientia Pharmaceutica*, 1960, 28, 287 - 303
- Brandt R., Leschik J.: Functional interactions of tau and their relevance for Alzheimer's disease; *Curr Alzheimer Res*, 2004, 1, 255 - 69
- Breitner J. C., Welsh K. A., Helms M. J., Gaskell P. C., *et al.*: Delayed onset of Alzheimer's disease with nonsteroidal anti-inflammatory and histamine H2 blocking drugs; *Neurobiol aging*, 1995, 16, 523 – 30
- Brennecke H. M., Thatcher D. N.: Production of pentaerythritol trinitrate; *Offenlegungsschrift US 3309397*, 1967
- Brodaty H., Ames D., Snowden J., Woodward M., *et al.*: A randomized placebo-controlled trial of risperidone for the treatment of aggression, agitation and psychosis of dementia; *J Clin Psychiatry*, 2003, 64, 134 – 43
- Brown R. C., Lockwood A. H., Sonawane B. R.: Neurodegenerative diseases: an overview of environmental risk factors; *Environ Health Perspect*, 2005, 113, 1250 – 6
- Brown J. F., Keates A. C., Hanson P. J., Whittle B. J.: Nitric oxide generators and cGMP stimulate mucus secretion by rat gastric mucosal cells; *Am J Physiol*, 1993, 265 (3 Pt 1), G418 - 22
- Brown J. F., Hanson P. J., Whittle B. J.: Nitric oxide donors increase mucus gel thickness in rat stomach; *Eur J Pharmacol*, 1992, 223, 103 - 4
- Burgaud J. L., Riffaud J. P., Del Soldato P.: Nitric oxide releasing molecules: a new class of drugs with several major indications; *Curr Pharm Des*, 2002, 8, 201 - 13
- Busciglio J., Lorenzo A., Yeh J., Yankner B. A.: beta-amyloid fibrils induce tau phosphorylation and loss of microtubule binding; *Neuron*, 1995, 14, 879 - 88
- Cai H., Wang Y., McCarthy D., Wen H., Borchelt D. R., Price D. L., Wong P. C.: BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons; *Nat Neurosci*, 2001, 4, 233 - 4
- Cainelli G., Giacomini D., Panunzio M., Martelli G., Spunta G.: Prostaglandins: synthesis of PGD₂ "via" 1,3-cyclopentandione; *Tetrahedron*, 1985, 41, 1385 – 92
- Cainelli G., Panunzio M., Basile T., Bongini A., Giacomini D., Martelli G.: Stereospecific synthesis of a chiral intermediate for the preparation of thienamycin, penems, and carbapenems: use of the nitro group as a hydroxy protecting group; *J Chem Soc, Perkin Trans. I*; 1987, 2637 – 42
- Camacho I. E., Serneels L., Spittaels K., Merchiers P., *et al.*: Peroxisome proliferator-activated receptor γ induces a clearance mechanism for the amyloid- β peptide; *J Neurosci*, 2004, 24, 10908 - 17
- Camp A. T., Marans N. S., Elrick D. E. Preckel R. F. : A new synthesis of pentaerythritol trinitrate; *J Am Chem Soc*, 1955, 77, 751 – 2
- Capell A., Beher D., Prokop S., Steiner H., Kaether C., Shearman M. S., Haass C.: Gamma-secretase complex assembly within the early secretory pathway; *J Biol Chem*, 2005, 280, 6471 – 8
- Capellos C., Fisco W. J., Ribaud C., Hogan V. D., Campisi J., *et al.*: Basic hydrolysis of glycerol nitrate esters. II. 1,2-Glycerol and 1,3-glycerol dinitrate esters; *Int J Chem Kinet*, 1984, 16, 1009 - 26
- Capellos C., Fisco W. J., Ribaud C., Hogan V. D., Campisi J., Murphy F. X., Rosenblatt D. H.: Basic hydrolysis of glycerol nitrate esters. I. 1- Glycerol and 2-glycerol nitrate esters; *Int J Chem Kinet*, 1982, 14, 903 - 17

- Cary S. P. L., Winger J. A., Marletta M. A.: Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP; *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, 102, 13064 – 9
- Ceynowa J., Rauchfleisz M.: High enantioselective resolution of racemic 2-arylpropionic acids in an enzyme membrane reactor; *J Mol Cat B: Enzymatic*, 2003, 23, 43 – 51
- Chan S. L., Mayne M., Holden C. P., Geiger J. D., Mattson M. P.: Presenilin-1 mutations increase levels of ryanodine receptors and calcium release in PC12 cells and cortical neurons; *J Biol Chem*, 2000, 275, 18195 - 200
- Chao C. C., Hu S., Sheng W. S., Bu D., Bukrinsky M. I., Peterson P. K.: Cytokine-stimulated astrocytes damage human neurons via a nitric oxide mechanism; *Glia*, 1996, 16, 276 - 84
- Chopin S., Delaunay J., Cousseau J.: [60]Fullerene diol issued from pentaerythritol derivatives ; *Tetrahedron Letters*, 2005, 46, 373 – 6
- Chyung J. H., Raper D. M., Selkoe D. J.: Gamma-secretase exists on the plasma membrane as an intact complex that accepts substrates and effects intramembrane cleavage; *J Biol Chem*, 2005, 280, 4383 – 92
- Colclough M. E., Hamid J., Kang G. S., Pelter A.: Process for the production of glycerol dinitrates; *Offenlegungsschrift WO200102336*, 2001
- Cole S. L., Vassar R.: Isoprenoids and Alzheimer's disease; *Neurobiol Dis*; 2006, 22, 209 - 22
- Combs C. K., Bates P., Karlo J. C., Landreth G. E.: Regulation of β -amyloid stimulated proinflammatory responses by peroxisome proliferator-activated receptor α ; *Neurochem Int*, 2001 a, 39, 449 - 57
- Combs C. K.; Karlo J. C., Kao S.-C., Landreth G. E.: β -Amyloid stimulation of microglia and monocytes results in TNF α -dependent expression of inducible nitric oxide synthase and neuronal apoptosis; *J Neurosci*, 2001 b, 21, 1179 - 88
- Combs C. K., Johnson D. E., Karlo J. C., Cannady S. B., Landreth G. E.: Inflammatory mechanisms in Alzheimer's disease: inhibition of beta-amyloid-stimulated proinflammatory responses and neurotoxicity by PPAR γ agonists; *J Neurosci*, 2000, 20, 558 – 67
- Combs C. K., Johnson D. J., Cannady S. B., *et al.*: Identification of microglial signal transduction pathways mediating a neurotoxic response to amyloidogenic fragments of beta-amyloid and prion proteins; *J Neurosci*, 1999, 19, 928 - 39
- Cooper J. A., Howell B. W.: Lipoprotein receptors: signaling functions in the brain?; *Cell*, 1999, 97, 671 - 4
- Cristol S. J., Franzus B., Shadan A.: Alkaline and neutral hydrolysis of 2-octyl nitrate; *J Am Chem Soc*, 1955, 77, 2512-15
- Cryer B., Feldman M.: Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs; *Am J Med*, 1998, 104, 413 - 21
- Czirr E., Weggen S.: γ -Secretase modulation with A β 42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs and derived compounds; *Neurodegenerative Dis*, 2006, 3, 298 - 304
- D'Andrea M. R., Cole G. M., Ard M. D.: The microglial phagocytic role with specific plaque types in the Alzheimer disease brain; *Neurobiol aging*, 2004, 25, 675 - 83
- Daravan S., Entezami A. A.: Acrylic type polymers containing ibuprofen and indomethacin with difunctional spacer group: synthesis and hydrolysis; *J Controlled Release*, 1997, 47, 41 – 49
- Darvesh S., Hopkins D. , Geula C.: Neurobiology of butyrylcholinesterase; *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4, 131 - 8
- Dash P. K., Moore A. N.: Enhanced processing of APP induced by IL-1 beta can be reduced by indomethacin and nordihydroguaiaretic acid; *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 208, 542 – 8
- Davies N. M., Roseth A. G., Appleyard C. B., McKnight W., Del Soldato P., Calignano A., Cirino G., Wallace J. L.: NO-naproxen vs. naproxen: ulcerogenic, analgesic and anti-inflammatory effects; *Aliment Pharmacol Ther*, 1997, 11, 69 – 79
- Del Soldato P., Santus G.: Cyclooxygenase-2 inhibitors; *Offenlegungsschrift WO2004000300*, 2003
- Del Soldato P., Sorrentino R., Pinto A.: NO-aspirins: a class of new anti-inflammatory and antithrombotic agents; *Trends Pharmacol Sci*, 1999, 20, 319 - 23

Del Soldato, P.: Nitric esters having anti-inflammatory and/or analgesic activity and process for their preparation; *Offenlegungsschrift WO9509831*, 1995

Deshpande A., Mina E., Glabe C., Busciglio J.: Different conformations of amyloid- β induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons; *J Neurosci*, 2006, 26, 6011 – 8

De Strooper B., Beullens M., Contreras B., Levesque L., *et al.*: Phosphorylation, subcellular localization, and membrane orientation of the Alzheimer's disease-associated presenilins; *J Biol Chem*, 1997, 272, 3590 - 8

Deutsch S. I., Rosse R. B., Lakshman R. M.: Dysregulation of tau phosphorylation is a hypothesized point of convergence in the pathogenesis of alzheimer's disease, frontotemporal dementia and schizophrenia with therapeutic implications; *Progr Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2006, 30, 1369 - 80

Dewachter I., Van Leuven F.: Secretases as targets for the treatment of Alzheimer's disease: the prospects; *Lancet Neurology*, 2002, 1, 409 – 16

Drewes G., Ebnet A., Mandelkow E. M.: MAPs, MARKs and microtubule dynamics; *Trends biochem Sci*, 1998, 23, 307 - 11

Droge W.: Free radicals in the physiological control of cell function; *Physiol Rev*, 2002, 82, 47 - 95

Du Z.-Y., Li X.-Y.: Inhibitory effects of indomethacin on interleukin-1 and nitric oxide production in rat microglia in vitro; *Int J Immunopharmacol*, 1999, 21, 219 - 25

Duchstein H.-J., Riederer S., Erbach C.: Active nitrogen species. A new research area for the pharmaceutical chemistry; *Pharm Unserer Z*, 1999, 28, 197 – 207

Ducrocq C., Servy C., Lenfant M.: Formation of glyceryl-2-mononitrate by regioselective bioconversion of glyceryl trinitrate: efficiency of the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*; *Biotechnol Appl Biochem*, 1990, 12, 325 - 30

Ducrocq C., Lecolier S., Lenfant M., Servy C., Wimmer E.: Glycerol nitrates manufactured from glycerol trinitrate by microbial action; *Offenlegungsschrift EP 325534*, 1989

Ducrocq C., Servy C., Lenfant M.: Bioconversion of glyceryl trinitrate into mononitrates by *Geotrichum candidum*; *FEMS Microbiol Lett*, 1989, 65, 219 – 22

Dufresne C., Berthelette C., Li L., Guay D., Gallant M., *et al.*: Nitric oxide releasing prodrugs of diaryl-2-(5H)-furanones as cyclooxygenase-2-inhibitors; *Offenlegungsschrift WO 2005070883*, 2005

Dunstan I., Griffiths J.V., Harvey S. A.: Nitric esters. Part I. Characterisation of the isomeric glycerol dinitrates; *J Chem Soc*, 1965 a, (Feb.), 1319 - 24

Dunstan I., Griffiths J.V., Harvey S. A.: Nitric esters. Part II. Characterisation of the isomeric glycerol mononitrates; *J Chem Soc*, 1965 b, (Feb.), 1325 - 7

Dykstra M., Cherukuri A., Sohn H. W., Tzeng S.-J., Pierce S. K.: Location is everything: lipid rafts and immune cell signaling; *Annu Rev Immunol*, 2003, 21, 457 - 81

Earl R. A., Ezawa M., Fang X., Garvey D. S., Gaston R. D., *et al.*: Preparation of nitrosated nonsteroidal antiinflammatory compounds; *Offenlegungsschrift WO 20040115*, 2004

Eckert A.: Calcium hypothesis in dementia. Significance of nimodipine in dementia therapy; *Pharm Unserer Z*, 2005, 34, 392 - 8

Ehehalt R., Keller P., Haass C., Thiele C., Simons K.: Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts; *J Cell Biol*, 2003, 160, 113 - 23

Elrick D. E., Gardner W. H., Marans N. S., Preckel R. F.: Preparation of Halides of Pentaerythritol trinitrate; *J Am Chem Soc*, 1954, 76, 1374 – 5

Eremenko L.T., Korolev A.M.: O-Nitration of primary and secondary unsaturated α -epoxy alcohols; *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya*, 1967, 5, 1142 - 4

Eremenko L.T., Korolev A.M.: A new variant of the Wagner oxidation of unsaturated compounds; *Izvestiya Akademii Nauk SSSR, Seriya Khimicheskaya*, 1970, 1, 147 - 9

- Eriksen J. L., Sagi S. A., Smith T. E., Weggen S., Das P., McLendon D. C., Ozols V. V., *et al.*: NSAIDs and enantiomers of flurbiprofen target γ -secretase and lower A β 42 *in vivo*; *J Clin Invest*, 2003, 112, 440 – 9
- Esch F. S., Keim P. S., Beattie E. C., Blacher R. W., Culwell A. R., Oltersdorf T., McClure D., Ward P. J.: Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor, *Science*, 1990, 248, 1122 - 4
- Estevez A. G., Spear N., Thompson J. A., Cornwell T. L., Radi R., Barbeito L., Beckman J. S.: Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor; *J Neurosci*, 1998, 18, 3708 - 14
- Etcheberrigaray R., Hirashima N., Nee L., Prince J., Govoni S., Racchi M., Tanzi R. E., Alkon D. L.: Calcium responses in fibroblasts from asymptomatic members of Alzheimer's disease families; *Neurobiol Dis*, 1998, 5, 37 - 45
- Etminan M., Gill S., Samii A.: Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on risk of Alzheimer's disease: Systematic review and meta-analysis of observational studies; *Brit Med J*, 2003, 327, 128 – 31
- Evin G., Sernee M. F., Masters C. L.: Inhibition of gamma-secretase as a therapeutic intervention for Alzheimer's disease: prospects, limitations and strategies; *CNS Drugs*, 2006, 20, 351 - 72
- Evin G., Weidemann A.: Biogenesis and metabolism of Alzheimer's disease Abeta amyloid peptides; *Peptides*, 2002, 23, 1285 - 97
- Fahrenholz F.: Alpha-secretase as a therapeutic target; *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4, 412 - 7
- Farinelli S. E., Park D. S., Greene L. A.: Nitric oxide delays the death of trophic factor-derived PC12 cells and sympathetic neurons by a cGMP-mediated mechanism; *J Neurosci*, 1996, 16, 2325 – 34
- Fassbender K.: Pharmacotherapy of dementias; *Akt Neurol*, 2003, 30, 512 - 8
- Fassbender K., Simons M., *et al.*: Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta -amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo; *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001, 98, 5856 - 61
- Fasulo L., Ugolini G., Visintin M., Bradbury A., Brancolini C., *et al.*: The neuronal microtubule-associated protein tau is a substrate for caspase-3 and an effector of apoptosis; *J Neurochem*, 2000, 75, 624 - 33
- Feldman P. L., Griffith O., Stuehr D. J.: The surprising life of nitric oxide; *Chem Eng News*, 1993, 71, 26 – 38
- Ferencik M., Novak M., Rovensky J., Rybar I.: Alzheimer's disease, inflammation and non-steroidal anti-inflammatory drugs; *Bratisl Lek Listy*, 2001, 102, 123 - 32
- Fillit H. M., O'Connell A. W., Refolo L. M.: Strategies for drug discovery for cognitive aging and Alzheimer's disease; *J Mol Neurosci*, 2002, 19, 1 – 3
- Fiorucci S., Del Soldato P.: NO-aspirin: mechanism of action and gastrointestinal safety; *Dig Liver Dis*, 2003, 35 Suppl 2, S9 - 19
- Fiorucci S., Antonelli E.: Cyclo-oxygenase isoenzymes. Structural basis for selective inhibition of cyclo-oxygenases by anti-inflammatory agents; *Dig Liver Dis*, 2001, 33 Suppl 2, S2 - 7
- Folstein M. F., Folstein S. E., McHugh P. R.: „Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician; *J Psychiatric Res*, 1975, 12, 189 - 98
- Fourrier A., Letenneur L., Begaud B., Dartigues J. F.: Nonsteroidal antiinflammatory drug use and cognitive function in the elderly: inconclusive results from a population-based cohort study; *J Clin Epidemiol*, 1996, 49, 1201
- Friebolin H.: Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie; VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim; 1988
- Frohberg P., Drutkowski G., Wobst I.: Monitoring eicosanoid biosynthesis via lipoxygenase and cyclo-oxygenase pathways in human whole blood by single HPLC run; *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41, 1317 – 24
- Fuchs S.: Oberflächenfunktionalisierte Poly(amidoamin)-Dendrimere als potentielle Trägermoleküle für Cytostatika; *Digitale Dissertation*, FU Berlin, 2004; <http://www.diss.fu-berlin.de/2004/99/>
- Fujii S., Matsumoto M., Igarashi K., Kato H., Mikoshiba K.: Synaptic plasticity in hippocampal CA1 neurons of mice lacking type 1 inositol-1,4,5-trisphosphate receptors; *Learn Mem*, 2000, 7, 312 - 20

Fujisawa H., Fujiwara T., Takeuchi Y., Omata K.: Synthesis and optical resolution of 2-aryl-2-fluoropropionic acids, fluorinated analogues of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs); *Chem Pharm Bull*, 2005, 53, 524 – 8

Fukumoto H., Cheung B. S., Hyman B. T., Irizarry M. C.: Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease; *Arch Neurol*, 2002, 59, 1381 – 9

Fukuyama R., Mizuno T., Mori S., Nakajima K., *et al.*: Age-dependent change in the levels of Abeta40 and Abeta42 in cerebrospinal fluid from control subjects, and a decrease in the ratio of Abeta42 to Abeta40 level in cerebrospinal fluid from Alzheimer's disease patients, *Eur Neurol*, 2000, 43, 155 - 60

Furukawa K., Barger S. W., Blalock E. M., Mattson M. P.: Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein; *Nat*, 1996, 379, 74 – 8

Gao Y., Pimplikar S. W.: The gamma -secretase-cleaved C-terminal fragment of amyloid precursor protein mediates signaling to the nucleus; *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001, 98, 14979 - 84

Garthwaite J., Garthwaite G., Palmer R. M. J., Moncada S.: NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices; *Eur J Pharmacol*, 1989, 172, 413 - 16

Garthwaite G., Garthwaite J.: Cyclic GMP and cell death in rat cerebellar slices; *Neurosci*, 1988, 26, 321 - 6

Garvey D. S., Letts L. G., Renfoe H. B., Tam S. W.: Compositions and methods to prevent toxicity induced by nonsteroidal antiinflammatory drugs; *Offenlegungsschrift US 5703073*; 1997

Gasparini L., Ongini E., Wilcock D., Morgan D.: Activity of flurbiprofen and chemically related anti-inflammatory drugs in models of Alzheimer's disease; *Brain Res Rev*, 2005, 48, 400 - 8

Gasparini L., Rusconi L., Xu H., del Soldato P., Ongini E.: Modulation of β -amyloid metabolism by non-steroidal anti-inflammatory drugs in neuronal cell cultures; *J Neurochem*, 2004a, 88, 337 - 48

Genazzani A. R., Pluchino N., Luisi S., Luisi M.: Estrogen, cognition and female ageing; *Human Reproduction Update*, 2007, 13, 175 – 87

Geula C., Mesulam M. M.: Cholinesterases and the pathology of Alzheimer's disease; *Alzheimer's Dis Assoc Disord*, 1995, 9, 23 - 8

Ghosh A. K., Hong L., Tang J.: Beta-secretase as a therapeutic target for inhibitor drugs; *Curr Med Chem*, 2002, 9, 1135 - 44

Gibb B. J., Garthwaite J.: Subunits of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, expressed in rat brain; *Eur Journal Neurosci*, 2001, 13, 539 - 44

Glabe C. G., Kayed R.: Common structure and toxic function of amyloid oligomers implies a common mechanism of pathogenesis; *Neurology*, 2006, 66, S74 - S78

Golde T. E., Eriksen J. L., Weggen S., *et al.*: Nonsteroidal antiinflammatory drugs as therapeutic agents for Alzheimer's disease; *Drug Dev Res*, 2002, 56, 415 - 20

Golde T. E., Eckman C. B.: Cholesterol modulation as an emerging strategy for the treatment of Alzheimer's disease; *Drug Discov Today*, 2001 a, 6, 1049 – 55

Golde T. E., Younkin S. G.: Presenilins as therapeutic targets for the treatment of Alzheimer's disease; *Trends Mol Med*, 2001 b, 7, 264 - 9

Golde T. E., Eckman C. B., Younkin S. G.: Biochemical detection of Abeta isoforms: implications for pathogenesis, diagnosis, and treatment of Alzheimer's disease; *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1502, 172 - 87

Golde T. E., Estus S., Younkin L. H., Selkoe D. J., Younkin S. G.: Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives; *Science*, 1992, 255, 728 - 30

Goldstein M., Pews R. G.: Preparation of Penterythritol mono- and dinitrate; *Chemistry and Industry*, 1966, 44, 1843

Gomez-Ramos A., Diaz-Hernandez M., Cuadros R., Hernandez F., Avila J.: Extracellular tau is toxic to neuronal cells; *FEBS Lett*, 2006, 580, 4842 – 50

Gong C.-X., Shaikh S., Wang J.-Z., Zaidi T., Grundke-Iqbal I., Iqbal K.: Phosphatase activity toward abnormally phosphorylated τ : decrease in Alzheimer disease brain; *J Neurochem*, 1995, 65, 732 - 8

- Griesbach R. C., Hamon D. P. G., Kennedy R. J.: Asymmetric dihydroxylation in an approach to the enantioselective synthesis of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs; *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, 8, 507 – 10
- Grill H., Reiter F., Schliak M., Löser R., Seibel K.: Neue Benzoessäurederivate, sowie Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung als Arzneimittel; *Offenlegungsschrift DE 3546324*, 1987
- Grimes C. A., Jope R. S.: The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 β in cellular signaling; *Progr Neurobiol*, 2001, 65, 391 - 426
- Gschwind M., Martin J. R., Moreau J. L., Huber G.: beta-APP cognitive function versus beta-amyloid--induced cell death; *Ann NY Acad Sci*, 1996, 777, 293 - 6
- Guo Q., Fu W., Sopher B. L., Miller M. W., Ware C. B., Martin G. M., Mattson M. P.: Increased vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic necrosis in presenilin-1 mutant knock-in mice; *Nat Med*, 1999, 5, 101 - 6
- Guo Q., Sopher B. L., Furukawa K., Pham D. G., Robinson N., Martin G. M., Mattson M. P.: Alzheimer's presenilin mutation sensitizes neural cells to apoptosis induced by trophic factor withdrawal and amyloid β -peptide: involvement of calcium and oxyradicals; *J Neurosci*, 1997, 17, 4212 - 22
- Guo Q., Furukawa K., Sopher B. L., *et al.*: Alzheimer's PS-1 mutation perturbs calcium homeostasis and sensitizes PC12 cells to death induced by amyloid β -peptide; *NeuroReport*, 1996, 8, 379 – 83
- Haass C., Lemere C. A., Capell A., Citron M., Seubert P., *et al.*: The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by beta-secretase cleavage within the secretory pathway; *Nat Med*, 1995, 1, 1291 – 6
- Haass C., Schlossmacher M. G., Hung A. Y., *et al.*: Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism; *Nature*, 1992, 359, 322 - 5
- Hakimelahi G. H., Sharghi H., Zarrinmayeh H., Khalafi-Nezhad A.: The synthesis and application of novel nitrating and nitrosating agents; *Helv Chim Acta*, 1984, 67, Fasc. 3, 906 - 15
- Hallauer J. F., Schons M., Smala A., Berger K.: Untersuchung von Krankheitskosten bei Patienten mit Alzheimer-Erkrankung in Deutschland; *Gesundheitsökonomie und Qualitätsmanagement*, 2000, 5, 73 – 9
- Hampel H., Padberg F., Möller H.-J. (Hrsg.): *Alzheimer-Demenz: klinische Verläufe, diagnostische Möglichkeiten, moderne Therapiestrategien*; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 2003
- Hanley M. R., Iversen L. L.: Muscarinic cholinergic receptors in rat corpus striatum and regulation of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate; *Mol Pharmacol*, 1978, 14, 246 – 55
- Hardy J. A., Higgins G. A.: Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis; *Science*, 1992, 256, 184 - 5
- Hawkey C. J.: Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy; *Gastroenterology*, 2000, 119, 521 – 35
- Heese K., Akatsu H.: Alzheimer's disease – an interactive perspective; *Curr Alzheimer's Res*; 2006, 3, 109 - 21
- Heinrichs M.: Weiterentwicklung eines Vollblutassays zur Bestimmung der Hemmaktivität potentieller COX-2-Inhibitoren; *Diplomarbeit*, Martin-Luther-Universität, Halle-Wittenberg, 2006
- Henderson V. W.: Estrogen -containing hormone therapy and Alzheimer 's disease risk: Understanding discrepant inferences from observational and experimental research; *Neurosci*, 2006, 138, 1031 – 9
- Henderson V. W.: Hormone therapy and Alzheimer's disease: benefit or harm?; *Exp Opin Pharmacotherapy*, 2004, 5, 389 - 406
- Henderson A. S., Jorm A. F., Christensen H., Jacomb P. A., Korten A. E.: Aspirin, anti-inflammatory drugs and risk of dementia; *Int J Geriatr Psychiatry*, 1997, 12, 926 - 30
- Heneka M. T., Wiesinger H., Dumitrescu-Ozimek L., Riederer P., Feinstein D. L., Klockgether T.: Neuronal and glial coexpression of argininosuccinate synthetase and inducible nitric oxide synthase in Alzheimer disease; *J Neuropathol Exp Neurol*, 2001 a, 60, 906 – 16
- Heneka, M. T., Landreth G. E., Feinstein D. L.: Role for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in Alzheimer's disease; *Ann Neurol*, 2001b, 49, 276
- Heneka M. T., Klockgether T., Feinstein D. L.: Peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligands reduce neuronal inducible nitric oxide synthase expression and cell death in vivo; *J Neurosci*, 2000, 20, 6862 - 7

Heneka M. T., Loschmann P.-A., Gleichmann M., Weller M., Schulz J. B., Wullner U., Klockgether T.: Induction of nitric oxide synthase and nitric oxide-mediated apoptosis in neuronal PC12 cells after stimulation with tumor necrosis factor- α /lipopolysaccharide; *J Neurochem*, 1998, 71, 88 – 94

Hess U., Windeck A.-K., Brosig H.: Pentaerythritol derivatives, their production and use and intermediates for their synthesis; *Offenlegungsschrift US 6180664*, 2001

Hess U., Brosig H., König G., Stoeter M.: Electrochemistry of pentaerythritol tetranitrate and metabolic structures; *Proc Electrochem Soc*; 2000, 2000-15, 57 - 9

Hiesberger T., Trommsdorff M., Howell B. W., et al.: Direct binding of reelin to VLDL receptor and apoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation; *Neuron*, 1999, 24, 481 - 9

Ho L., Qin W., Stetka B. S., Pasinetti G. M.: Is there a future for cyclo-oxygenase inhibitors in Alzheimer's disease?; *CNS Drugs*, 2006, 20, 85 - 98

Ho G. J., Drego R., Hakimian E., Masliah E.: Mechanisms of cell signaling and inflammation in Alzheimer's disease; *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2005, 4, 247 – 56

Höfler D., Lasek R., Berthold H. K.: Therapieempfehlungen der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft: Demenz; Berlin, 3. Auflage 2004; http://www.akdae.de/35/70_Demenz_2004_3Auflage.pdf

Holsinger R. M. D., McLean C. A., Beyreuther K., Masters C. L., Evin G.: Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease; *Ann Neurol*, 2002, 51, 783 – 6

Hu S., Peterson P. K., Chao C. C.: Cytokine-mediated neuronal apoptosis; *Neurochem Int*, 1997, 30, 427 - 31

Hung A. Y., Haass C., Nitsch R. M., Qiu W. Q., et al.: Activation of protein kinase C inhibits cellular production of the amyloid β -protein; *J Biol Chem*, 1993, 268, 22959 – 62

Ignarro L. J., Aeberhard E. E., Henderson S. A.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent transcriptional expression of the inducible NO synthase gene in macrophages by interference with NF- κ B activation; *Portland Press Proc*, 1996, 10 (Biology of Nitric Oxide Part 5), 5

Ilczuk A.: Search for anticholinergic compounds V. Synthesis and reactions of 5-chloro-2-phenyl-1,3-dioxane; *Acta Pol Pharm*, 1978, 35, 1 – 6

Imahori K., Uchida T.: Physiology and pathology of tau protein kinases in relation to Alzheimer's disease; *J Biochem*, 1997, 121, 179 – 88

Inestrosa N. C., Alvarez A., Dinamarca M. C., Perez-Acle T., Colombres M.: Acetylcholinesterase-amyloid- β -peptide interaction: effect of Congo Red and the role of the Wnt pathway; *Curr Alzheimer Res*, 2005, 2, 301 – 6

Inestrosa N. C., Alvarez A., Perez C. A., Moreno R. D., Vicente M., Linker C., Casanueva O. I., Soto C., Garrido J.: Acetylcholinesterase accelerates assembly of amyloid- β -peptides into Alzheimer's fibrils: possible role of the peripheral site of the enzyme; *Neuron*, 1996, 16, 881 - 91

Ingram M. J., Moynihan H. A., Powell M. W., Roston C.: Synthesis and hydrolytic behavior of glycerol-1,2-diibuprofenate-3-nitrate, a putative pro-drug of ibuprofen and glycerol-1-nitrate; *J Pharm Pharmacol*, 2001, 53, 345 – 50

In't Veld B. A., Ruitenbergh A., Hofman A., Launer L. J., van Duijn C. M., Stijnen T., Breteler M. M. B., Stricker B. H. C.: Nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of Alzheimer's disease; *N Engl J Med*, 2001, 345, 1515 – 21

Intq 1-24, siehe hinten

Iqbal K., Del C. A. A., Chen S., Chohan M. O., El-Akkad E., Gong C.-X., et al.: Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies; *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1739, 198 - 210

Ishii K., Muelhauser F., Liebl U., Picard M., Kuhl S., Penke B., Bayer T., Wiessler M., Hennerici M., Beyreuther K., Hartmann T., Fassbender K.: Subacute NO generation induced by Alzheimer's beta-amyloid in the living brain: reversal by inhibition of the inducible NO synthase; *FASEB*, 2000, 14, 1485 - 9

Jain N. K., Patil C. S., Kartasmita R. E., Decker M., Lehmann J., Kulkarni S. K.: Pharmacological studies on nitro-naproxen (naproxen-2-nitroethylester); *Drug Dev Res*, 2004, 61, 66 – 78

- Jantzen P. T., Connor K. E., DiCarlo G., Wenk G. L., *et al.*: Microglial activation and beta -amyloid deposit reduction caused by a nitric oxide-releasing nonsteroidal anti-inflammatory drug in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mice; *J Neurosci*, 2002, 22, 2246 - 54
- Janus C., Pearson J., McLaurin J., Mathews P. M., *et al.*: A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of Alzheimer's disease; *Nat*, 2000, 408, 979 – 82
- Jaradat M. S., Wongsud B., Phornchirasilp S., Rangwala S. M., *et al.*: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor isoforms and inhibition of prostaglandin H(2) synthases by ibuprofen, naproxen, and indomethacin; *Biochem Pharmacol*, 2001, 62, 1587 – 95
- Jiang, C., Ting A. T., Seed B.: PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines; *Nature*, 1998, 391, 82 – 6
- Jick H., Zornberg G. L., Jick S. S., Seshadri S., Drachman D. A.: Statins and the risk of dementia; *Lancet*, 2000, 356, 1627 – 31
- Johal K., Hanson P. J.: Opposite effects of flurbiprofen and the nitroxybutyl ester of flurbiprofen on apoptosis in cultured guinea-pig gastric mucous cells; *Brit J Pharmacol*, 2000, 130, 811 – 8
- Johnson J. W., Ascher P.: Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons; *Nat*, 1987, 325, 529 - 31
- Karkos J.: Immuntherapie der Alzheimer-Krankheit: Experimentelle Untersuchungsergebnisse und Behandlungsperspektiven; *Fortschr Neurol Psychiatr*, 2004, 72, 204 - 19
- Kashfi K.: Compounds and Compositions for treating dysproliferative diseases, and methods of use thereof; *Offenlegungsschrift WO 2005065361*; 2005
- Katz I. R., Jeste D. V., Mintzer J. E., Clyde C., Napolitano J., Brecher M.: Comparison of risperidone and placebo for psychosis and behavioral disturbances associated with dementia: a randomized, double-blind trial. Risperidone study group; *J Clin Psychiatry*, 1999, 60, 107 – 15
- Kawahara M.: Disruption of Calcium homeostasis in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other conformational diseases; *Curr Alzheimer Res*, 2004, 1, 87 – 95
- Kawahara M., Kuroda Y.: Intracellular calcium changes in neuronal cells induced by Alzheimer's beta-amyloid protein are blocked by estradiol and cholesterol; *Cell Mol Neurobiol*, 2001, 21, 1 - 13
- Kawahara M., Kuroda Y.: Molecular mechanism of neurodegeneration induced by Alzheimer's β -amyloid protein: channel formation and disruption of calcium homeostasis; *Brain Res Bull*, 2000, 53, 389 – 97
- Keeble J. E., Moore P. K.: Pharmacology and potential therapeutic applications of nitric oxide-releasing non-steroidal anti-inflammatory and related nitric oxide-donating drugs; *Brit J Pharmacol*, 2002, 137, 295 - 310
- Keeble J., Al-Swayeh O. A., Moore P. K.: Vasorelaxant effect of nitric oxide releasing steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs; *Brit J Pharmacol*, 2001, 133, 1023 – 8
- Keiner, S.: Zellproliferation und –differenzierung in der Umgebung experimentell induzierter Hirninfarkte bei der Ratte – Einfluß von rehabilitativem Training und intrahekalen Applikation des Wachstumsfaktors brain-derived neurotrophic factor sowie des Zytostatikums Cytarabin; *Dissertation*, Universität Jena, 2007
- Keller J. N.: Age-related neuropathology, cognitive decline, and Alzheimer's disease; *Ageing Res Rev*, 2006, 5, 1 -13
- Klegeris A., McGeer P. L.: Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and other anti-inflammatory agents in the treatment of neurodegenerative diseases; *Curr Alzheimer Res*, 2005, 2, 355 - 65
- Koehler H.: Highly pure partially nitrated glycerols; *Offenlegungsschrift DE 3514868*, 1986
- König A.: Pentaerythrityltetranitrat, Glyceryltrinitrat, deren bioaktive Metabolite und andere NO-basierende Vasodilatoren – Beziehungen zwischen Struktur und Wirkung; *Dissertation*, Friedrich-Schiller-Universität Jena, 2008
- König A., Roegler C., Lange K., Daiber A., Glusa E., Lehmann J.: NO donors. Part 16: Investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator; *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17, 5881 – 5

König A., Lange K., Konter J., Daiber A., Stalleicken D., Glusa E., Lehmann J.: Potency and in vitro tolerance of organic nitrates: Partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythrityl tetranitrate; *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50, 68 - 74

König A., Pietig I., Homann A., Glusa E., Fricke U., Lehmann J.: Pharmakologische Charakterisierung von Pentaerythritolteranitrat, seinen nitrathaltigen Metaboliten und anderen organischen Nitraten an der isolierten Pulmonalarterie des Schweins; In *Pentaerythrityltetranitrat*; Erdmann E., Mutschler E., Stalleicken D., Hrsg.; Steinkopff Verlag Darmstadt, 2004, 59 – 68

Kojro E., Gimpl G., Lammich S., Marz W., Fahrenholz F.: Low cholesterol stimulates the nonamyloidogenic pathway by its effect on the alpha - secretase ADAM 10; *Proc Nat Acad Sci USA*, 2001, 98, 5815 - 20

Kontush A., Schekatolina S.: An update on using vitamin E in Alzheimer 's disease; *Exp Opin Drug Discov*, 2008, 3, 261 – 71

Korolev A. M. , Eremenko L. T., Meshikhina L. V., Eremenko I. L., Aleksandrov G. G., Konovalova N. P., Lodygina V. P.: Synthesis and study of organic nitrates of heterofunctional series; *Russ Chem Bull*, 2003, 52, 1859 – 63

Korzeniewski C., Callewaert D.M.: An enzyme-release assay for natural cytotoxicity; *J Immunol Methods*, 1983, 64, 313 – 20

Kukar T., Murphy M. P., Eriksen J. L., Sagi S. A., Weggen S., Smith T. E., Ladd T., *et al.*: Diverse compounds mimic Alzheimer disease-causing mutations by augmenting Abeta42 production; *Nat Med*, 2005, 11, 545 – 50

Kulkarni S. K., Jain N. K., Singh A.: Nitric oxide-releasing NSAIDs: a new dimension in nonsteroidal antiinflammatory drugs; *Drugs Future*, 2001, 26, 485 - 9

Kulkarni S. K., Jain N. K., Singh A.: Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors; *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2000, 22, 291 - 8

Kunze A., Grass S., Witte O. W., Yamaguchi M., Kempermann G., Redecker C.: Proliferative response of distinct hippocampal progenitor cell populations after cortical infarcts in the adult brain; *Neurobiol Dis*, 2006, 21, 324 - 32

LaFerla F. M.: Calcium dyshomeostasis and intracellular signaling in Alzheimer's disease; *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3, 862 – 72

Lammich S., Kojro E., Postina R., Gilbert S., Pfeiffer R., Jasionowski M., Haass C., Fahrenholz F.: Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease; *Proc Nat Acad Sci USA*, 1999, 96, 3922 – 7

Landreth G.: Therapeutic use of agonists of the nuclear receptor PPARgamma in Alzheimer's disease; *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4, 159 - 64

Landreth G. E., Heneka M. T.: Anti-inflammatory actions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists in Alzheimer's disease; *Neurobiol Aging*, 2001, 22, 937 – 44

Lange K., König A., Roegler C., Seeling A., Lehmann J: Bioactive metabolites of GTN and PETN – synthesis and vasorelaxant properties; *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, angenommen

Lange K., König A., Seeling A., Lehmann J: NO donors. Part 18: Bioactive Metabolites of PETN – Synthesis, Vasodilator Potency and NSAID-Hybrid Molecules; Poster, *DPhG-Jahrestagung*, Marburg, 2006, C101, book of abstracts S.129

Le Bars P. L., Katz M. M., Berman N., Itil T. M., Freedman A. M., Schatzberg A. F.: A placebo-controlled, double-blind, randomized trial of an extract of Ginkgo biloba for dementia. North American EGb Study Group; *J Am Med Assoc*, 1997, 278, 1327 - 32

Legocki J., Hackel J.: Nitrate of alkyl esters of α,β -unsaturated acids. III. Dinitrates of n-alkyl esters; *Przemysl Chemiczny*, 1967, 46, 214 – 18

Lehmann J. M., Lenhard J. M., Oliver B. B., Ringold G. M., Kliewer S. A.: Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs; *J Biol Chem*, 1997, 272, 3406 - 10

Leissring M. A., Murphy M. P., Mead T. R., Akbari Y., *et al.*: A physiologic signaling role for the XXXX-secretase-derived intracellular fragment of APP; *Proc Nat Acad Sci USA*, 2002, 99, 4697 – 702

- Lemberger T., Desvergne B., Wahli W.: Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology; *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1996, 12, 335 – 63
- Lhiaubet-Vallet V., Belmadoui N., Climent M. J., Miranda M. A.: The long-lived triplet excited state of an elongated ketoprofen derivative and its interactions with amino acids and nucleosides; *J Phys Chem B*, 2007, 111, 8277 – 82
- Li G., Higdon R., Kukull W. A., Peskind E., Moore K. Van Valen, *et al.*: Statin therapy and risk of dementia in the elderly: A community-based prospective cohort study; *Neurol*, 2004, 63, 1624 - 8
- Li T., Ma G., Cai H., Price D. L., Wong P. C.: Nicastrin is required for assembly of presenilin/ γ -secretase complexes to mediate Notch signaling and for processing and trafficking of β -amyloid precursor protein in mammals; *J Neurosci*, 2003, 23, 3272 – 7
- Li Y., Liu L., Barger S. W., Griffin W. S. T.: Interleukin-1 mediates pathological effects of microglia on tau phosphorylation and on synaptophysin synthesis in cortical neurons through a p38-MAPK pathway; *J Neurosci*, 2003, 23, 1605 - 11
- Li A. C., Brown K. K., Silvestre M. J., Willson T. M., Palinski W., Glass C. K.: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice; *J Clin Invest*, 2000 a, 106, 523 - 31
- Li B., *et al.*: Abundant tissue butyrylcholinesterase and its possible function in the acetylcholinesterase knockout mouse; *J Neurochem*, 2000 b, 75, 1320 - 31
- Lilienfeld S.: Galantamine – a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease; *CNS Drug Rev*, 2002, 8, 159 – 76
- Lindwall G., Cole R. D.: Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly; *J Biol Chem*, 1984, 259, 5301 - 5
- Lipton S. A., Choi Y. B., Pan Z. H., Lei S. Z., *et al.*: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds; *Nat*, 1993, 364, 626 - 32
- Little J. T., Walsh S., Aisen P. S.: An update on huperzine A as a treatment for Alzheimer's disease; *Exp Opin Invest Drugs*, 2008, 17, 209 – 15
- Lleo A., Galea E., Sastre M.: Molecular targets of non-steroidal anti-inflammatory drugs in neurodegenerative diseases; *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64, 1403 - 18
- Lleó A., Greenberg S. M., Growdon J. H.: Current pharmacotherapy for Alzheimer's disease; *Annu Rev Med*, 2006, 57, 513 – 33
- Lleo A., Berezovska O., Herl L., Raju S., Deng A., Bacskaï B. J., *et al.*: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs lower Abeta42 and change presenilin 1 conformation; *Nat Med*, 2004, 10, 1065 - 6
- Lolli M. L., Cena C., Medana C., Lazzarato L., Morini G., Coruzzi G., Manarini S., Fruttero R., Gasco A.: A new class of ibuprofen derivatives with reduced gastrotoxicity; *J Med Chem*, 2001, 44, 3463 – 8
- Lopez-Arrieta J. M., Birks J.: Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia; *Cochrane database of systematic reviews*, 2002, 3, CD000147
- Lu Y. F., Kandel E. R., Hawkins R. D.: Nitric oxide signaling contributes to late-phase LTP and CREB phosphorylation in the hippocampus; *J Neurosci*, 1999, 19, 10250 – 61
- Lu Q., Wood J. G.: Functional studies of Alzheimer's disease tau protein; *J Neurosci*, 1993, 13, 508 - 15
- Lucas S.-M., Rothwell N. J., Gibson R. M.: The role of inflammation in CNS injury and disease; *Brit J Pharmacol*, 2006, 147(Suppl. 1), S232 - S240
- Lundbaek J. A., Birn P., Girshman J., Hansen A. J., Andersen O. S.: Membrane stiffness and channel function; *Biochem*, 1996, 35, 3825 - 30
- Lundkvist J., Naslund J.: Gamma-secretase: a complex target for Alzheimer's disease; *Curr Opin Pharmacol*, 2007, 7, 112 - 8
- Luo Y., Bolon B., Kahn S., Bennett B. D., Babu-Khan S., *et al.*: Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation; *Nat Neurosci*, 2001, 4, 231 – 2

- Mackenzie I. R.: Anti-inflammatory drugs and Alzheimer-type pathology in aging; *Neurology*, 2000, 54, 732 - 4
- Mandelkow E.-M., Thies E., Trinczek B., Biernat J., Mandelkow E.: MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons; *J Cell Biol*, 2004, 167, 99 - 110
- Mandelkow E.-M., Mandelkow E.: Tau in Alzheimer's disease; *Trends Cell Biol*, 1998, 8, 425 - 7
- Marans N. S., Elrick D. E., Preckel R. F.: Organic acid esters of pentaerythritol trinitrate; *J Am Chem Soc*, 1954, 76, 1304 - 6
- Markesbery W. R., Carney J. M.: Oxidative alterations in Alzheimer's disease; *Brain Pathol*, 1999, 9, 133 - 46
- Matji J., Alcaide A.: Nitric esters of derivatives of the 2-(2,6-di-halophenylamino)phenylacetic acid and process for their preparation; *Offenlegungsschrift WO 9404484*, 1994
- Mattson M. P.: Pathways towards and away from Alzheimer's disease; *Nat*, 2004, 430, 631 - 9
- Mattson M. P., Chan S. L.: Neuronal and glial calcium signaling in Alzheimer's disease; *Cell Calcium*, 2003, 34, 385 - 97
- Mattson M. P., LaFerla F. M., Chan S. L., Leissring M. A., Shepel P. N., Geiger J. D.: Calcium signaling in the ER: its role in neuronal plasticity and neurodegenerative disorders; *Trends Neurosci*, 2000 a, 23, 222 - 9
- Mattson M. P.: Apoptosis in neurodegenerative disorders; *Nat Rev. Mol Cell Biol*, 2000 b, 1, 120 - 9
- Mattson M. P.: Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives; *Physiol Rev*, 1997, 77, 1081 - 132
- Mattson M. P.: Calcium and neuronal injury in Alzheimer's disease. Contributions of β -amyloid precursor protein mismetabolism, free radicals, and metabolic compromise; *Ann NY Acad Sci*, 1994, 747, 50 - 76
- Mattson M. P., Barger S. W., Cheng B., Lieberburg I., et al.: β -Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal calcium homeostasis in Alzheimer's disease; *Trends Neurosci*, 1993 a, 16, 409 - 14
- Mattson M. P., Cheng B., Culwell A. R., Esch F. S., Lieberburg I., Rydel R. E.: Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein; *Neuron*, 1993 b, 10, 243 - 54
- Mattson M. P., Engle M. G., Rychlik B.: Effects of elevated intracellular calcium levels on the cytoskeleton and tau in cultured human cortical neurons; *Mol Chem Neuropathol*, 1991, 15, 117 - 42
- Mazanetz M. P., Fischer P. M.: Untangling tau hyperphosphorylation in drug design for neurodegenerative diseases; *Nat Rev*, 2007, 6, 464 - 79
- McGeer P. L., McGeer E. G.: Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease; *Neurobiol Aging*, 2001, 22, 799 - 809
- McGeer P. L., McGeer E., Rogers J., Sibley J.: Anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease; *Lancet*, 1990, 335, 1037
- McKillop A., Young D. W., Edwards M., Hug R. P.: Thallium in organic synthesis. 53. Simple procedures for the replacement of a phenolic OH group by N = NAr, N = O, H, NH₂, and C substituents; *J Org Chem*, 1978, 43, 3773 - 4
- McKillop A., Ford M. E.: Mercury-assisted solvolyses of alkyl halides : Simple procedures for the preparation of nitrate esters, acetate esters, alcohols and ethers; *Tetrahedron*, 1974, 15, 2467 - 75
- Meese C. O., Drews R., Cawello A., Paar F.: Neue Salpetersäureester des Pentaerythrits; *Offenlegungsschrift DE 19745622*, 1999
- Mehta P. D.: Amyloid beta protein as a marker or risk factor of Alzheimer's disease; *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4, 359 - 63
- Mellstrom B., Naranjo J. R.: Mechanisms of Ca²⁺-dependent transcription; *Curr Opin Neurobiol*, 2001, 11, 312 - 9
- Marrow R. T., van Dolah R. W.: Reactions of nitrate esters. II. Reactions with hydrazine; *J Am Chem Soc*, 1954, 76, 4522 - 5

- Mesulam M. M., *et al.*: Acetylcholinesterase knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine; *Neuroscience*, 2002, 110, 627 – 39
- Mi K., Johnson G. V. W.: The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease; *Curr Alzheimer Res*, 2006, 3, 449 - 63
- Miida T., Takahashi A., Tanabe N., Ikeuchi T.: Can statin therapy really reduce the risk of Alzheimer's disease and slow its progression ?; *Curr Opin Lipidol*, 2005, 16, 619 - 23
- Milioni D.-A., Boziki M.-K., Georgiadou S., Voulgaridou A., Mironidou-Tzouveleki M.: Evidenced based medicine for the use of piracetam aiming at therapeutic intervention in problems associated with brain dysfunction; *Epitheorese Klinikes Farmakologias kai Farmakokinetikes*, 2007, 25, 175 - 88
- Mills J., Reiner P. B.: Regulation of amyloid precursor protein cleavage; *J Neurochem*, 1999, 72, 443 - 60
- Milnes J., Rogers K., Jones S., Gormally J.: The laser desorption/laser ionization mass spectra of some anti-inflammatory drugs; *Int J Mass Spectrom Ion Processes*, 1994, 132, 49 - 55
- Mitchell D. A., Erwin P. A., Michel T., Marletta M. A.: S-Nitrosation and Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase; *Biochem*, 2005, 44, 4636 – 47
- Mitchell J. A., Warner T. D.: Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy; *Brit J Pharmacol*, 1999, 128, 1121 - 32
- Mody I., MacDonald J. F.: NMDA receptor-dependent excitotoxicity: the role of intracellular Ca²⁺ release; *Trends Pharmacol Sci*, 1995, 16, 356 - 9
- Moncada S., Higgs A.: The L-arginine-nitric oxide pathway; *New Engl J Med*, 1993, 329, 2002 – 12
- Moncada S., Palmer R. M., Higgs E. A.: Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology; *Pharmacol Rev*, 1991, 43, 109 - 42
- Morich F., Bieber F., Lewis J., Kaiser L., Cutler N., *et al.*: Nimodipine in the treatment of probable Alzheimer's disease. Results of two multi-centre trials; *Clin Drug Invest*, 1996, 11, 185 – 95
- Moriyama T., Chu T., Ubeda O., Beech W., Cole G. M.: Selective inhibition of A β 42 production by NSAID R-enantiomers; *J Neurochem*, 2002, 83, 1009 - 12
- Morrone R., Nicolosi G., Piattelli M.: Use of orthoesters for the synthesis of chiral acids in biocatalyzed irreversible esterification processes; *Offenlegungsschrift US 6953678*, 2005
- Murad F.: Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signalling; *Biosci Rep*, 2004, 24, 452 – 74
- Murphy M. P., *et al.*: Presenilin 1 regulates pharmacologically distinct gamma-secretase activities. Implications for the role of presenilin in gamma-secretase-cleavage; *J Biol Chem*, 2000, 275, 26277 - 84
- Murphy M. P.: Nitric oxide and cell death; *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1411, 401 – 14
- Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H. K., Schäfer-Korting M.: Mutschler Arzneimittelwirkungen; 2001, *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, Stuttgart
- Nakamura T., Barbara J. G., Nakamura K., Ross W. N.: Synergistic release of Ca²⁺ from IP₃-sensitive stores evoked by synaptic activation of mGluRs paired with backpropagating action potentials; *Neuron*, 1999, 24, 727 - 37
- Newman M., Musgrave I. F., Musgrave F. I., Lardelli M.: Alzheimer disease: amyloidogenesis, the presenilins and animal models; *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772, 285 - 97
- Nichols P. L., Magnusson A. B., Ingham J. D.: Synthesis of nitric esters by the addition of nitric acid to the ethylene oxide ring; *J Am Chem Soc*, 1953, 75, 4255 – 8
- Nitsch R. M., Slack B. E., Wurtman R. J., Growdon J. H.: Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors; *Science*, 1992, 258, 304 - 7
- Nixon R. A., Saito K. -I., Grynspan F., Griffin W. R., Katayama S., *et al.*: Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease; *Ann NY Acad Sci*, 1994, 747, 77 - 91

Ogawa O., Umegaki H., Sumi D., *et al.*: Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression by indomethacin or ibuprofen in beta-amyloid protein-stimulated J774 cells; *Eur J Pharmacol*, 2000, 408, 137 – 41

Oken B. S., Storzbach D. M., Kaye J. A.: The efficacy of Gingko biloba on cognitive function an Alzheimer's disease; *Arch Neurol*, 1998, 55, 1409 - 15

Oláh G., Noszkó L., Kuhn S., Szelke M.: Preparation of nitrosamines, alkylnitriles, and alkyl nitrates with nitrosyl and nityl tetrafluoroborate; *Chem Ber*, 1956, 89, 2374 – 7

Onor M. L., Trevisiol M., Aguglia E.: Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update; *Clin Intervent Aging*, 2007, 2, 17 - 32

Paris D., Town T., Parker T., Humphrey J., Mullan M.: beta-Amyloid vasoactivity and proinflammation in microglia can be blocked by cGMP-elevating agents; *Ann NY Acad Sci*, 2000, 903, 446 - 50

Paris G. Y., Garmaise D. L., Cimon D. G. : Glycerides as prodrugs. 3. Synthesis and anti-inflammatory activity of [1-(*p*-Chlorobenzoyl)-5-methoxy-2-methylindole-3-acetyl]glycerides (Indomethacin Triglyceride); *J Med Chem*, 1980, 23, 9 – 12

Paris G. Y., Garmaise D. L., Cimon D. G. : Glycerides as prodrugs. 1. Synthesis and anti-inflammatory activity of 1,3-Bis(alkanoyl)-2-(*O*-acetylsalicyloyl)glycerides (Aspirin Triglyceride); *J Med Chem*, 1979, 22, 683 – 7

Pasinetti G. M., Aisen P. S.: Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain; *Neurosci*, 1998, 87, 319 - 24

Pasternak S. H., Bagshaw R. D., Guiral M., *et al.*: Presenilin-1, Nicastrin, Amyloid Precursor Protein, and gamma-Secretase Activity Are Co-localized in the Lysosomal Membrane; *J Biol Chem*, 2003, 278, 26687 - 94

Peretto I., Radaelli S., Parini C., Zandi M., *et al.*: Synthesis and biological activity of flurbiprofen analogues as selective inhibitors of β -amyloid1-42 secretion; *J Med Chem*, 2005, 48, 5705 – 20

Perry E. K., Perry R. H., Blessed G., Tomlinson E.: Changes in brain cholinesterases in senile dementia of Alzheimer type; *Neuropath Appl Neurobiol*, 1978, 4, 273 - 7

Pickhardt M., von Bergen M., Gazova Z., Hascher A., Biernat J., Mandelkow E.-M., Mandelkow E.: Screening for inhibitors of tau polymerization; *Curr Alzheimer Res*, 2005, 2, 219 - 26

Pierrot N., Santos S. F., Feyt C., *et al.*: Calcium-mediated transient phosphorylation of tau and amyloid precursor protein followed by intra-neuronal amyloid- β acumulation; *J Biol Chem*, 2006, 281, 39907 - 14

Pierrot N., Ghisdal P., *et al.*: Intraneuronal amyloid- β 1-42 production triggered by sustained increase of cytosolic calcium concentration induces neuronal death; *J Neurochem*, 2004, 88, 1140 - 50

Postina R.: A closer look at α -secretase; *Curr Alzheimer Res*, 2008, 5, 179 - 86

Pozzoli C., Castaldi G.: Process for the preparation of enantiomers of 2-(2-fluoro-4-biphenyl)-propionic acid; *Offenlegungsschrift EP 0719755*, 1996

Prosperi C., Scali C., Pepeu G., Casamenti F.: NO-flurbiprofen attenuates excitotoxin-induced brain inflammation, and releases nitric oxide in the brain; *Jpn J Pharmacol*, 2001, 86, 230 - 5

Querfurth H. W., Selkoe D. J.: Calcium ionophore increases amyloid β peptide production by cultured cells; *Biochem*, 1994, 33, 4550 – 61

Quintanilla R. A., Orellana D. I., Gonzalez-Billault C., Maccioni R. B.: Interleukin-6 induces Alzheimer-type phosphorylation of tau protein by deregulating the cdk5/p35 pathway; *Exp Cell Res*, 2004, 295, 245 - 57

Quizilbash N., Lopez-Arrieta J., Birks J.: Nimodipine for primary degenerative, mixed and vascular dementia (Cochrane Review); *The Cochrane Library*, 4. Auflage, Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1999

Ramassamy C., Longpre F., Christen Y.: Ginkgo biloba extract (EGb 761) in Alzheimer 's disease: is there any evidence?; *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4, 253 – 62

Read J., Hurst E.:The conversion of allyl alcohol to glyceryl chloro- and bromo-hydrins; *J. Chem. Soc., Trans.*, 1922, 989 – 99

Refolo L. M., Pappolla M. A., LaFrancois J., Malester B., *et al.*: A cholesterol-lowering drug reduces beta-amyloid pathology in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease; *Neurobiol Dis*, 2001, 8, 890 - 9

- Reisberg B., Doody R., Stoffler A., Schmitt F., Ferris S., Mobius H. J.: Memantine in moderate to severe Alzheimer's disease; *N Engl J Med*, 2003, 348, 1333 – 41
- Reuter B. K., Cirino G., Wallace J. L.: Markedly reduced intestinal toxicity of a diclofenac derivative; *Life Sci*, 1994, 55, PL1 - 8
- Ricote M., Glass C. K.: PPARs and molecular mechanisms of transrepression; *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1771, 926 - 35
- Ricote M., Li A. C., Willson T. M., Kelly C. J., Glass C. K.: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation; *Nat*, 1998, 391, 79 - 82
- Roberds S. L., Anderson J., Basi G., Bienkowski M. J., Branstetter D. G., Chen K. S., et al.: BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics; *Human Mol Genet*, 2001, 10, 1317 – 24
- Rogers S. L.: Perspectives in the management of Alzheimer's disease: clinical profil of donepezil; *Dement Geriatr Cogn Disord*, 1998 a, 9 (Suppl. 3), 29 – 42
- Rogers S. L., Farlow M. R., Doody R. S., Mohs R. Friedhoff L. T. and the Donepezil Study Group: A 24-week, double-blind, placebo-controlled trial of donepezil in patients with Alzheimer's disease; *Neurology*, 1998 b, 50, 136 – 45
- Rogers J., Kirby L. C., Hempelmann S. R., et al.: Clinical trial of indomethacin in Alzheimer's disease; *Neurology*, 1993, 43, 1609 - 11
- Rolewicz H. A., Grimes C. D. Jr., Stevenson K. Jr.: Preparation of pentaerythritol trinitrate; *Offenlegungsschrift US 3408383*, 1968
- Roth M., Mountjoy C. Q., Amrein R.: Moclobemide in elderly patients with cognitive decline and depression: an international, double-blind, placebo-controlled trial; *Br J Psychiatry*, 1996, 168, 149 – 57
- Saez T. E., Pehar M., Vargas M., Barbeito L., Maccioni R. B.: Astrocytic nitric oxide triggers tau hyperphosphorylation in hippocampal neurons; *In vivo* (Athens, Greece), 2004, 18, 275 - 80
- Sano M., Ernesto C., Thomas R. G., Klauber M. R., et al.: A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study; *New Engl J Med*, 1997, 336, 1216 – 22
- Sastre M., Dewachter I., Rossner S., Bogdanovic N., Rosen E., Borghgraef P., et al.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs repress beta-secretase gene promoter activity by the activation of PPARgamma. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2006 a, 103, 443 - 8
- Sastre M., Klockgether T., Heneka M. T.: Contribution of inflammatory processes to Alzheimer's disease: molecular mechanisms; *Int J Devl Neuroscience*, 2006 b, 24, 167 – 76
- Sastre M., Dewachter I., Landreth G. E., Willson T. M., et al.: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists modulate immunostimulated processing of amyloid precursor protein through regulation of beta-secretase; *J Neurosci*, 2003, 23, 9796 – 804
- Scharf S., Mander A., Ugoni A., et al.: A double-blind, placebo-controlled trial of diclofenac/misoprostol in Alzheimer's disease; *Neurology*, 1999, 53, 197 - 201
- Schenk D.: Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning, *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3, 824 - 8
- Schenk D., Barbour R., Dunn W., et al.: Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse; *Nature*, 1999, 400, 173 – 7
- Schenker E.: Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie IV. Anwendung von komplexen Borhydriden und von Diboran in der organischen Chemie; *Angew Chem*, 1961, 73, 81 – 124
- Schmidt B., Baumann S., Narlawar R., Braun H. A., Larbig G.: Modulators and inhibitors of beta- and gamma-secretases; *Neurodegenerative Dis*, 2006, 3, 290 - 7
- Schmidt H. H. H. W.: NO, endogener Botenstoff und Zellgift; *Med Mo Pharm*, 1994 a, 6, 169 – 85
- Schmidt H. H., Walter U.: NO at work; *Cell*, 1994 b, 78, 919 - 25

Selinsky B. S., Gupta K., Sharkey C. T., Loll P. J.: Structural analysis of NSAID binding by prostaglandin H₂ synthase: time-dependent and time-independent inhibitors elicit identical enzyme conformations; *Biochem*, 2001, 40, 5172 – 80

Selkoe D. J.: Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease; *J Biol Chem*, 1996, 271, 18295 - 8

Shan R., Velazquez C., Knaus E. E.: Syntheses, calcium channel agonist – antagonist modulation activities, and nitric oxide release studies of nitrooxyalkyl 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3-nitro-4-(2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)pyridine-5-carboxylate. racemates, enantiomers, and diastereomers; *J Med Chem*, 2004, 47, 254 - 61

Shumaker S. A., Legault C., Kuller L., Rapp S. R., *et al.*: Conjugated equine estrogens and incidence of probable dementia and mild cognitive impairment in postmenopausal women. Women's Health Initiative Memory Study; *J Am Med Assoc*, 2004, 291, 2947 - 58

Simecek J.: Organic nitrates. I. Preparation and properties of pentaerythritol nitrates; *Coll Czech Chem Comm*, 1962, 27, 362 - 71

Simons M., Schwärzler F., Lütjohann D., *et al.*: Treatment with simvastatin in normocholesterolemic patients with Alzheimer's disease: a 26-week randomized, placebo-controlled, double-blind trial; *Ann Neurol*, 2002, 52, 346 – 50

Sisodia S. S., St. George-Hyslop P. H.: Gamma-secretase, NOTCH, A β and Alzheimer's disease: where do the presenilins fit in ?; *Nat Rev Neurosci*, 2002, 3, 281 - 90

Snowdon D. A.: Aging and Alzheimer's disease: lessons from the Nun Study; *Gerontologist*, 1997, 37, 150 - 6

Solomon P. R., Adams F., Silver A., *et al.*: Gingko for memory enhancement: a randomized controlled trial; *J Am Med Assoc*, 2002, 288, 835 – 40

Sontag E., Luangpirom A., Hladik C., Mudrak I., Ogris E., Speciale S., White C. L. 3rd: Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A β Alphac enzyme are associated with Alzheimer disease pathology; *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63, 287 - 301

Sontag E., Nunbhakdi-Craig V., Lee G., Bloom G. S., Mumby M. C.: Regulation of the phosphorylation state and microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A; *Neuron*, 1996, 17, 1201 - 7

Sparks D. L., Sabbagh M. N., Connor D. J., Lopez J., Launer L. J., Browne P., *et al.*: Atorvastatin for the treatment of mild to moderate Alzheimer disease: preliminary results; *Arch Neurol*, 2005, 62, 753 – 7

Steiner H.: Uncovering gamma-secretase; *Curr Alzheimer Res*, 2004, 1, 175 - 81

Steinmetz R. D., Fava E., Nicotera P., Steinhilber D.: A simple cell line based in vitro test system for N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor ligands; *J Neurosci Met*, 2002, 113, 99 - 110

Stewart W. F., Kawas C., Corrada M., Metter E. J.: Risk of Alzheimer's disease and duration of NSAID use; *Neurology*, 1997, 48, 626 – 32

St. George-Hyslop P. H.: Hilfe bei Alzheimer?; *Spektrum der Wissenschaft*, 2001, 3, 45 - 51

Stoothoff W. H., Johnson G. V. W.: Tau phosphorylation: physiological and pathological consequences; *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1739, 280 - 97

Stozicka Z., Zilka N., Novak M.: Risk and protective factors for sporadic Alzheimer's disease; *Acta Virol*, 2007, 51, 205 – 22

Stutzmann G. E.: The pathogenesis of Alzheimers disease-is it a lifelong calciumopathy?; *Neuroscientist*, 2007, 13, 546 - 9

Stutzmann G. E., Smith I., Caccamo A., Oddo S., LaFerla F. M., Parker I.: Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca²⁺ disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice; *J Neurosci*, 2006, 26, 5180 – 9

Stutzmann G. E.: Calcium dysregulation, IP3 signaling, and Alzheimer's disease; *Neuroscientist*, 2005, 11, 110 - 5

Stutzmann G. E., Caccamo A., LaFerla F. M., Parker I.: Dysregulated IP3 signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in Presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability; *J Neurosci*, 2004, 24, 508 - 13

- Stutzmann G. E., LaFerla F. M., Parker I.: Ca^{2+} signaling in mouse cortical neurons studied by two-photon imaging and photoreleased inositol triphosphate; *J Neurosci*, 2003, 23, 758 - 65
- Sugaya K., Uz T., Kumar V., Manev H. : New anti-inflammatory treatment strategy in Alzheimer's disease; *Jpn J Pharmacol*, 2000, 82, 85 – 94
- Svoboda J., Palecek J., Mostecký J.: Estery arylalkanových kyselin s 1,3-diglyceridy a způsob jejich výroby; *Offenlegungsschrift CS 263920*, 1989
- Svoboda J., Palecek J., Grimova J., Maturova E.: Some glycerides of arylpropionic acids; *Cesko-Slovenska Farmacie*, 1989, 38, 16 – 8
- Svoboda J., Palecek J., Mostecký J.: Triglyceridy 2-arylpropionových kyselin; *Offenlegungsschrift CS 262009*, 1990
- Takashima A., Murayama M., Murayama O., Kohno T., *et al.*: Presenilin 1 associates with glycogen synthase kinase-3 β and its substrate tau; *Proc Nat Acad Sci USA*, 1998, 95, 9637 - 41
- Takasugi N., Tomita T., Hayashi I., Tsuruoka M., Niimura M., Takahashi Y., Thinakaran G., Iwatsubo T.: The role of presenilin cofactors in the gamma-secretase complex; *Nat*, 2003, 422, 438 - 41
- Takeuchi K., Ukawa H., Konaka A., *et al.*: Effect of nitric oxide-releasing aspirin derivative on gastric functional and ulcerogenic responses in rats: comparison with plain aspirin; *J Pharmacol Exp Ther*, 1998, 286, 115 - 121
- Tamami B., Iranpoor N., Rezaie R.: Synthesis of azidohydrins, nitrohydrins and nitratohydrins from epoxides using azide, nitrite and nitrate exchange resins; *Iranian Polymer J*, 2004, Vol. 13, 6, 495 - 501
- Tandon A., Fraser P.: The presenilins; *Genome Biol*, 2002, 3, reviews3014
- Tang J., He X., Huang X., Hong L.: Recent developments on the studies of human memapsin 2 (beta-secretase); *Curr Alzheimer Res*, 2005, 2, 261 - 4
- Tarassishin L., Yin Y. I., Bassit B., Li Y.-M.: Processing of Notch and amyloid precursor protein by gamma-secretase is spatially distinct; *Proc Nat Acad Sci USA*, 2004, 101, 17050 - 5
- Terai K., Iwai A., Kawabata S., Tasaki Y., Watanabe T., Miyata K., Yamaguchi T.: Beta-amyloid deposits in transgenic mice expressing human beta-amyloid precursor protein have the same characteristics as those in Alzheimer's disease; *Neuroscience*, 2001, 104, 299 - 310
- Thatcher G. R. J., Bennett B. M., Reynolds J. N.: NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*, 2006, 3, 237 - 45
- Thatcher G. R. J., Bennett B. M., Reynolds J. N.: Nitric oxide mimetic molecules as therapeutic agents in Alzheimer's disease; *Curr Alzheimer Res*, 2005, 2, 171 - 82
- Thatcher G. R. J., Niculescu A. C., Bennett B. M., Toader V.: Nitrates and NO release: Contemporary aspects in biological and medicinal chemistry; *Free Radic Biol Med*, 2004, 37, 1122 - 43
- Townsend K. P., Pratico D.: Novel therapeutic opportunities for Alzheimer's disease: focus on nonsteroidal anti-inflammatory drugs; *FASEB*, 2005, 19, 1592 - 601
- Troy C. M., Rabacchi S. A., Friedman W. J., Frappier T. F., Brown K., Shelanski M. L.: Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by β -amyloid; *J Neurosci*, 2000, 20, 1386 - 92
- Uemura K., Kuzuya A., Shimohama S.: Protein trafficking and Alzheimer's disease; *Curr Alzheimer Res*, 2004, 1, 1 – 10
- Urano Y., Hayashi I., Isoo N., Reid P. C., Shibasaki Y., Noguchi N., Tomita T., Iwatsubo T., Hamakubo T., Kodama T.: Association of active gamma-secretase complex with lipid rafts; *J Lipid Res*, 2005, 46, 904 - 12
- van Dongen M., van Rossum E., Kessels A. G., Sielhorst H. J., Knipschild P. G.: The efficacy of ginkgo for elderly people with dementia and age associated memory impairment: new results of a randomized clinical trial; *J Am Geriatr Soc*, 2000, 48, 1183 – 94
- van Dongen M., van Rossum E., Kessels A. G., *et al.*: Ginkgo for elderly people with dementia and age associated memory impairment: a randomized clinical trial; *J Clin Epidemiol*, 2003, 56, 367 – 76

Vane J. R., Botting R. M.: Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action; *Inflamm Res*, 1998, 47 Suppl 2, S78 - 87

Vane J.: Towards a better aspirin; *Nat*, 1994, 367, 215 – 6

Vane J. R.: Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs; *Nat: New Biol*, 1971, 231, 232 - 5

Vassar R.: Beta-secretase (BACE) as a drug target for Alzheimer's disease; *Adv Drug Delivery Rev*, 2002, 54, 1589 - 602

Vetrivel K. S., Cheng H., Lin W., Sakurai T., Li T., *et al.*: Association of gamma-secretase with lipid rafts in post-Golgi and endosome membranes; *J Biol Chem*, 2004, 279, 44945 – 54

Vincent B., Cisse M. A., Sunyach C., *et al.*: Regulation of betaAPP and PrPc cleavage by alpha-secretase: mechanistic and therapeutic perspectives; *Curr Alzheimer Res*, 2008, 5, 202 – 11

Vincent B.: ADAM proteases: protective role in Alzheimer's and prion diseases?; *Curr Alzheimer Res*, 2004, 1, 165 - 74

Vlad S. C., Miller D. R., Kowall N. W., Felson D. T.: Protective effects of NSAIDs on the development of Alzheimer disease; *Neurology*, 2008, 70, 1672 – 7

Vogelsberg-Ragaglia V., Schuck T., Trojanowski J. Q., Lee V. M.: PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus; *Exp Neurol*, 2001, 168, 402 - 12

Wahrle S., Das P., Nyborg A. C., McLendon C., Shoji M., *et al.*: Cholesterol-dependent gamma-secretase activity in buoyant cholesterol-rich membrane microdomains; *Neurobiol Dis*, 2002, 9, 11 - 23

Wallace J. L., Muscara M. N., De Nucci G., Zamuner S., Cirino G., Del Soldato P., Ongini E.: Gastric tolerability and prolonged prostaglandin inhibition in the brain with a nitric oxide-releasing flurbiprofen derivative, NCX-2216 [3-[4-(2-fluoro-alpha-methyl-[1,1'-biphenyl]-4-acetyloxy)-3-methoxyphenyl]-2-propenoic acid 4-nitrooxy butyl ester]; *J Pharmacol Exp Ther*, 2004, 309, 626 - 633

Wallace J. L., Cirino G., McKnight G. W., Elliott S. N.: Reduction of gastrointestinal injury in acute endotoxic shock by flurbiprofen nitroxybutylester; *Eur J Pharmacol*, 1995 a, 280, 63 - 8

Wallace J. L., McKnight W., Del Soldato P., Baydoun A. R., Cirino G.: Anti-thrombotic effects of a nitric oxide-releasing, gastric-sparing aspirin derivative; *J Clin Invest*, 1995 b, 96, 2711 - 18

Wallace J. L., Reuter B., Cicala C., McKnight W., Grisham M., Cirino G.: A diclofenac derivative without ulcerogenic properties; *Eur J Pharmacol*, 1994 a, 257, 249 - 55

Wallace J. L., Reuter B., Cicala C., McKnight W., Grisham M. B., Cirino G.: Novel nonsteroidal anti-inflammatory drug derivatives with markedly reduced ulcerogenic properties in the rat; *Gastroenterology*, 1994 b, 107, 173 - 9

Wallace J. L.: Gastric ulceration: Critical events at the neutrophil-endothelium interface; *Can J Physiol Pharmacol*, 1993, 71, 98 - 102

Wechter W. J., Schwartz E. B.: R-NSAID esters and their use; *Offenlegungsschrift US 20040067914*, 2004

Weggen S., Rogers M., Eriksen J.: NSAIDs: small molecules for prevention of Alzheimer's disease or precursors for future drug development?; *Trends Pharmacol Sci*, 2007, 28, 536 - 43

Weggen S., Eriksen J. L., Sagi S. A., *et al.*: Evidence that nonsteroidal anti-inflammatory drugs decrease amyloid β 42 production by direct modulation of γ -secretase activity; *J Biol Chem*, 2003 a, 278, 31831 - 7

Weggen S., Eriksen J. L., Sagi S. A., Pietrzik C. U., Golde T. E., Koo E. H.: A β 42-lowering nonsteroidal anti-inflammatory drugs preserve intramembrane cleavage of the amyloid precursor protein (APP) and ErbB-4 receptor and signaling through the APP intracellular domain; *J Biol Chem*, 2003 b, 278, 30748 - 54

Weggen S., Eriksen J. L., Das P., Sagi S. A., Wang R., Pietrzik C. U., *et al.*: A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity; *Nat*, 2001, 414, 212 - 6

Weldon D. T., Rogers S. D., Ghilardi J. R., Finke M. P., Cleary J. P., O'Hare E., Esler W. P., Maggio J. E., Mantyh P. W.: Fibrillar beta-amyloid induces microglial phagocytosis, expression of inducible nitric oxide synthase, and loss of a select population of neurons in the rat CNS in vivo; *J Neurosci*, 1998, 18, 2161 - 73

- Wenk G. L., Rosi S., McGann K., Hauss-Wegrzyniak B.: A nitric oxide-donating flurbiprofen derivative reduces neuroinflammation without interacting with galantamine in the rat; *Eur J Pharmacol*, 2002, 453, 319 – 24
- Wessler C., Homann A., Fricke U., Lehmann J.: NO donors, part 8 [1]: synthesis and vasodilating activities of substituted benzylnitrates compared to cyclohexylmethylnitrate and GTN; *Eur J Med Chem*, 2003, 38, 581 - 6
- Whalley L. J., Deary I. J., Appleton C. L., Starr J. M.: Cognitive reserve and the neurobiology of cognitive aging; *Ageing Res Rev*, 2004, 3, 369 – 82
- Whitnack, G. C., Nielsen J. M., Gantz E. St. Clair: Polarographic reduction of polynitrate esters; *J Am Chem Soc*, 1954, 76, 4711 – 4
- Whittle B. J. R.: Neuronal and endothelium-derived mediators in the modulation of the gastric microcirculation: integrity in the balance; *Brit. J Pharmacol*, 1993, 110, 3 - 17
- Wilcock G. K.: Disease-modifying treatments for Alzheimer's disease: A perspective based on experience with R-Flurbiprofen; *Alzheimer's & Dementia*, 2006, 2, 150 – 2
- Wilcock G. K., Lilienfeld S., Gaens E.: Efficacy and safety of galantamine in patients with mild to moderate Alzheimer's disease: multicentre randomized controlled trial; *Brit Med J*, 2000, 321, 1445 – 8
- Will W.: Über Glycerin-nitrate; *Chem Ber*, 1908, 41, 1107 - 25
- Wimmer E. P., Lecolier S. L., Ducrocq C. A., Servy C. G., Lenfant M. T.: Process for the synthesis of glyceryl mononitrates by bioconversion of nitroglycerin; *Offenlegungsschrift US 4985357*, 1991
- Winblad B., Poritis N.: Memantine in severe dementia: results of the 9M-Best Study (Benefit and efficacy in severely demented patients during treatment with memantine); *Int J Geriatr Psychiatry*, 1999, 14, 135 - 46
- Wohl A., Neuberg C.: Über saure Ester der Borsäure; *Ber*, 1899, 32, 3488 - 92
- Wolfe M. S.: Gamma -secretase modulators; *Curr Alzheimer Res*, 2007, 4, 571 - 3
- Wolfe M. S.: The gamma-secretase complex: membrane-embedded proteolytic ensemble; *Biochem*, 2006, 45, 7931 - 9
- Wolozin B., Kellman W., Ruosseau P., Celesia G. G., Siegel G.: Decreased prevalence of Alzheimer Disease associated with 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors; *Arch Neurol*, 2000, 57, 1439 – 43
- Wurm F., Keiner S., Kunze A., Witte O. W., Redecker C.: Effects of skilled forelimb training on hippocampal neurogenesis and spatial learning after focal cortical infarcts in the adult rat brain; *Stroke*, 2007, 38, 2833 – 40
- Xie L., Helmerhorst E., Taddei K., *et al.*: Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor; *J Neurosci*, 2002, 22, RC221
- Xu H., Gouras G. K., Greenfield J. P., Vincent B., Naslund J., *et al.*: Estrogen reduces neuronal generation of Alzheimer beta-amyloid peptides; *Nat Med*, 1998, 4, 447 - 51
- Yang L.-B., Lindholm K., Yan R., Citron M., Xia W., Yang X.-L., *et al.*: Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease; *Nat Med*, 2003, 9, 3 - 4
- Younkin S. G.: Amyloid beta vaccination: reduced plaques and improved cognition; *Nat Med*, 2001, 7, 18 - 9
- Zaffaroni A.: Glycerol esterified with 2-naphthyl-acetic acids and fatty acids; *Offenlegungsschrift US 3686238*, 1972
- Zandi P. P., Anthony J. C., Hayden K. M., Mehta K., Mayer L., Breitner J. C. S.: Reduced incidence of AD with NSAID but not H2 receptor antagonists: the Cache County Study; *Neurology*, 2002, 59, 880 – 6
- Zhou S., Zhou H., Walian P. J., Jap B. K.: Regulation of gamma-secretase activity in Alzheimer's disease; *Biochem*, 2007, 46, 2553 - 63
- Zhou S., Zhou H., Walian P. J., Jap B. K.: CD147 is a regulatory subunit of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease amyloid beta-peptide production; *Proc Nat Acad Sci USA*, 2005, 102, 7499 – 504
- Zhu Y. J., Lin H., Lal R.: Fresh and nonfibrillar amyloid β -protein(1-40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for A β P-channel-mediated cellular toxicity; *FASEB*, 2000, 14, 1244 - 54

Ziakas G.N., Rekkas E.A., Gavalas A.M., Eleftheriou P. T., *et al.*: Nitric oxide releasing derivatives of tolafenamic acid with antiinflammatory activity and safe gastrointestinal profile; *Bioorg Med Chem*, 2005, 13, 6485 – 6492

Zilka N., Ferencik M., Hulin I.: Neuroinflammation in Alzheimer's disease: protector or promotor ?; *Bratisl Lek Listy*, 2006, 107, 374 – 83

Zimmermann M., Gardoni F., Di Luca M.: Molecular rationale for the pharmacological treatment of Alzheimer's disease; *Drugs Aging*, 2005, 22 Suppl. 1, 27 - 37

Internetquellen:

Intq 1 : http://www.fu-berlin.de/presse/fup/2007/fup_07_230/index.html

Intq 2 : <http://www.msnbc.msn.com/id/19168359/>

Intq 3 : <http://www.medfuehrer.de/cms/?f=5&n=10&ns=240&sn=35&printmode=1&>

Intq 4 : <http://www.netdoktor.de/topic/alzheimer/stadien.htm>

Intq 5 : <http://www.alzheimer-forschung.de/web/alzheimerkrankheit/faqs.htm#jump1364>

Intq 6 : <http://www.alzheimer-selbsthilfe.at/web/Krankheit/AlzheimerKrankheit2.htm>

Intq 7 : http://www.ebixa.ch/content/downloadarea/pdf/MMSE_und_Uhrentest_d.pdf

Intq 8 : http://www.merz.de/presse/pressemappen_gesundheit/alzheimer/verlauf/

Intq 9 : <http://de.wikipedia.org/wiki/DSM/ICD>

Intq 10 : http://edoc.ub.uni-muenchen.de/7189/1/Rocha-Unold_Manoela.pdf

Intq 11 : <http://www.gigermid.ch/eCart/www/img/categoryImages/GMD-Kategorie/Gehirn%20mit%20Alzheimer.jpg>

Intq 12 : <http://med.kuleuven.be/legtegg/AD.html>

Intq 13 : http://www.deutsche-alzheimer.de/fileadmin/alz/pdf/factsheets/FactSheet01_01.pdf

Intq 14 : http://www.alzheimer.de/alzheimer/was_ist_alzheimer/haeufigkeit/content-147696.html

Intq 15 : https://www.studentenservice.novartis.de/content_pdf/innovartis/i9820511.pdf

Intq 16 : <http://www.liv.ac.uk/researchintelligence/issue30/alzheimers.html>

Intq 17 : <http://idw-online.de/pages/de/image58141>

Intq 18 : <http://www.nature.com/nrm/journal/v6/n1/full/nrm1548.html>

Intq 19 : <http://www.chemie.tu-darmstadt.de/Fachgebiete/OC/AKSchmidt/Research.htm>

Intq 20 : http://pathology.ouhsc.edu/DeptLabs/Alzheimer/neurofibrillary_tangles.htm

Intq 21 : <http://www.thieme-connect.com/ejournals/pdf/aktneu/doi/10.1055/s-2003-45013.pdf>

Intq 22 : <http://www.medizininfo.de/kopfundseele/alzheimer/memantine.shtml>

Intq 23 : <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00574132?term=bapineuzumab&rank=1>

Intq 24 : <http://www.medscape.com/content/2003/00/46/65/466536/art-apt466536.fig4.gif>

Persönliche Daten:

Name:	Lange
Vorname:	Kathrin
Berufsbezeichnung:	Apothekerin
Geburtsdatum:	23.08.1978
Geburtsort:	Friedrichroda (Thüringen)
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulischer Werdegang:

1985 - 1991	Polytechnische Oberschule (POS) „Albert Schweitzer“ in Gotha (Thüringen)
1991 - 1997	Gymnasium „Ernestinum“ in Gotha (Thüringen)
1997	Abschluß der schulischen Ausbildung mit Erhalt des Abiturs

Studium:

01.10.1997 – 30.03.2002	Studium der Pharmazie an der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
22.09.2003	Erhalt der Approbation als Apothekerin
01.10.2002 – 30.04.2004	Teilzeitstudium Ostslawistik

Praktische Tätigkeit:

21.04.2002 - 20.10.2002	Praktikum im „Wordsley Hospital“ in Birmingham/England
15.11.2002 - 14.05.2003	Praktikum in der Kernberg-Apotheke in Jena
01.07.2003 - 30.09.2003	Studentische Hilfskraft am Institut für Pharmazeutische/Medizinische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena

Berufliche Tätigkeit:

seit 01.10.2003	Promotion und wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmazeutische/Medizinische Chemie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena
-----------------	--

Originalarbeiten:

NO donors. Part 18: Bioactive Metabolites of GTN and PETN - Synthesis and Vasorelaxant Properties

Kathrin Lange, Andreas Koenig, Carolin Roegler, Andreas Seeling, Jochen Lehmann.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2008, im Druck

NO donors. Investigations on structure-activity relationships of organic mononitrates reveal 2-nitrooxyethylammoniumnitrate as a high potent vasodilator.

Koenig, Andreas; Roegler, Carolin; **Lange, Kathrin**; Daiber, Andreas; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2007**, 17, 5881-5885

Potency and *in vitro* tolerance of organic nitrates: partially denitrated metabolites contribute to the tolerance-devoid activity of pentaerythrityl tetranitrate.

Koenig, Andreas; **Lange, Kathrin**; Konter, Joerg; Daiber, Andreas; Stalleicken, Dirk; Glusa, Erika; Lehmann, Jochen.

Journal of Cardiovascular Pharmacology, **2007**, 50, 68-74

Number of nitrate groups determines reactivity and potency of organic nitrates: a proof of concept study in ALDH-2^{-/-} mice.

Wenzel, P.; Hink, U.; Oelze, M.; Seeling, A.; Isse, T.; Bruns, K.; Steinhoff, L.; Brandt, M.; Kleschyov, A. L.; Schulz, E.; **Lange, K.**; Weiner, H.; Lehmann, J.; Lackner, K. J.; Kawamoto, T.; Muenzel, T.; Daiber, A.

British Journal of Pharmacology, **2007**, 150, 526-533

Poster:

Bioactive Metabolites of PETN – Synthesis, Vasodilator Potency and NSAID-Hybrid Molecules. **Lange, Kathrin**; Koenig, Andreas; Seeling, Andreas; Lehmann, Jochen.

DPhG-Jahrestagung, Marburg, **2006**, C101, book of abstracts S.129

Vorträge:

Erste Ergebnisse zur Synthese von PETN-Metaboliten und PExN-Hybridmolekülen

Lange, Kathrin; Lehmann, Jochen

Minisymposium „Chemische, pharmakologische und medizinische Aspekte von PETN und anderen NO-Donoren“, Jena, **2005**

Hiermit erkläre ich,

daß mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist,

daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe,

daß ich weder die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe, noch Dritte unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen im Zusammenhang mit dem Inhalt meiner Dissertation von mir erhalten haben und

daß ich vorliegende Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung und keine weitere Dissertation an einer anderen Hochschule eingereicht habe.

Jena, im Juni 2008